



Entwicklung eines neuartigen Ansatzes zur therapeutischen Vakzinierung chronischer HBV-Infektionen

**Vom Fachbereich Biologie
der Technischen Universität Darmstadt**

Zur Erlangung des Grades
Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

**Dissertation
von Tobias Zahn**

Erstgutachterin: Prof. Dr. Beatrix Süß
Zweitgutachter: Prof. Dr. Eberhard Hildt

Langen 2020

Zahn, Tobias: Entwicklung eines neuartigen Ansatzes zur therapeutischen Vakzinierung
chronischer HBV-Infektionen
Darmstadt, Technische Universität Darmstadt
Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUpriints: 2020
Tag der mündlichen Prüfung: 17.06.2020

Veröffentlichung unter CC-BY-SA 4.0 International
<https://creativecommons.org/licenses>

Zusammenfassung

Aktuell leiden weltweit etwa 257 Millionen Menschen an einer chronischen Hepatitis-B-Virus-Infektion. In den meisten Fällen ist eine ungenügende T-Zellantwort für die Entwicklung einer Chronizität verantwortlich. Um eine ausreichende zelluläre, zytotoxische T-Zellantwort hervorzurufen und die Produktion neutralisierender Antikörper zu induzieren, wurde eine neuartige Impfstoffplattform etabliert, welche auf modifizierten, zellpermeablen Capsiden des Hepatitis-B-Virus (HBV) basiert. Die Permeabilität wurde durch die Fusion des Membran-permeablen Peptids *Translocation motif* (TLM) an die HBV Core-Protein-Monomere erreicht, aus welchen sich das Capsid assembliert (TLMcapside). Durch die Insertion eines Strep-tagIII in die *Spike-tip* Domäne, welche sich auf der Oberfläche der Capside befindet, können Antigene, welche mit Streptavidin fusioniert wurden, flexibel auf die Trägercapside geladen werden. In dieser Arbeit wurden die Domänen PreS1 und PreS2 der HBV-Oberflächenproteine mit monomerem Streptavidin fusioniert (mSA_preS1/2), um sie als Antigene auf die Oberfläche der Capside zu laden. Antigene und Capside wurden in bakteriellen Expressionssystemen produziert und mittels Affinitätschromatografie gereinigt. Die Bindung zwischen Antigen und Capsid wurde mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie, Transmissionselektronenmikroskopie und Dichtegradientenzentrifugation charakterisiert. Unter Verwendung von konfokaler *Laser-scanning*-Mikroskopie und *in-vivo-Imaging* konnte die Membranpermeabilität der mSA_preS1/2-beladenen TLMcapside und deren Ausbreitung durch Zellen, Hautschichten, Organe und den gesamten Organismus festgestellt werden. Die Immunisierung von Mäusen mit den zellpermeablen, beladenen Capsiden führte einerseits zu einer starken humoralen Immunantwort mit HBV-spezifischen neutralisierenden Antikörpern und andererseits zu einer spezifischen T-Zellantwort, welche in der Eliminierung von HBV-positiven Zellen resultierte. Die Membranpermeabilität dieser Trägercapside ermöglicht zudem eine Nadel-freie, nichtinvasive Verabreichung von Antigen-beladenen Capsiden. Dies wurde durch die Immunisierung mithilfe von Pflastern über die transdermale Route sowie über die oral-mukosale Aufnahme über die Mundschleimhäute beobachtet. Bei erfolgreicher Immunisierung konnte somit eine HBV-spezifische T-Zell- und B-Zellantwort induziert werden. Die erhobenen Daten weisen darauf hin, dass die permeablen mSA_preS1/2-beladenen TLMcapside die Kapazität besitzen, eine starke, zelluläre sowie eine neutralisierende, humorale Immunantwort auszulösen, weshalb sie als therapeutisches Vakzin gegen chronische HBV-Infektionen eingesetzt werden könnten. Zusätzlich ermöglicht die Zellpermeabilität dieser Impfstoffplattform den Antigentransfer über mehrere Zellschichten und erlaubt somit alternative, nichtinvasive Routen wie oral-mukosale und transdermale Immunisierung.

Abstract

There are approximately 257 million people suffering from chronic hepatitis B virus infection worldwide. In most cases, an insufficient T cell response is causative for developing chronicity. To generate a robust CTL response and induce expression of neutralizing antibodies, a novel vaccine platform was established, based on modified, cell permeable hepatitis B virus (HBV) capsids. Permeability is achieved by fusion of the membrane-permeable translocation motif (TLM) to HBV core proteins, which assemble to capsids (TLMcapsids). By insertion of a Strep-tagIII into the spike tip domain, localized on the capsids surface, streptavidin-fused antigens can be loaded on to these permeable carrier capsids. In this study, HBV surface protein domains PreS1 and PreS2 were fused with monomeric streptavidin (mSA_preS1/2) to generate an antigen that can be coupled onto the capsids. Antigens and capsids were produced in a bacterial expression system and purified via affinity chromatography. Binding efficiency between both components was determined with surface plasmon resonance spectroscopy, transmission electron microscopy and density gradient centrifugation. Using confocal laser scanning microscopy and *in vivo* imaging, membrane permeability of mSA_preS1/2-loaded TLMcapsids and their spread through cells, skin tissue, organs and whole organisms was characterized. Immunization of mice with cell-permeable, loaded capsids led to induction of a strong humoral immune response with HBV-specific neutralizing antibodies and to a specific T cell response, resulting in the elimination of HBV-positive target cells. Membrane permeability also enables needle-free and noninvasive administration of antigen-loaded capsids. This was proven by vaccination via transdermal route using patches and via oral-mucosal up-take through mucosal mouth tissue. After successful immunization, an HBV-specific T cell and B cell response could be induced. Data of this study suggest that permeable mSA_preS1/2-loaded TLMcapsids are able to induce a robust cellular as well as a neutralizing humoral immune response. The antigen-loaded TLMcapsids could therefore be utilized as a therapeutic vaccine against chronic HBV infections. Additionally, cell permeability of this vaccine platform enables antigen transfer through several cell layers and could therefore permit alternative, noninvasive routes like oral-mucosal and transdermal immunization.

*"Come mothers and fathers
throughout the land
and don't criticize
what you can't understand."*

– Bob Dylan, 1964

Inhalt

Zusammenfassung	
Abstract	
1 Einleitung.....	1
1.1 Hepatitis-B-Virus (HBV)	1
1.1.1 Entdeckung.....	1
1.1.2 Taxonomie	1
1.1.3 Struktur	2
1.1.4 S, PreS1 und PreS2.....	4
1.1.5 HBV Core und Capsid.....	6
1.1.6 Genom	8
1.1.7 HBV Lebenszyklus.....	9
1.2 HBV-Infektion.....	13
1.2.1 Übertragung und Prävalenz	13
1.2.2 Akute HBV-Infektion.....	14
1.2.3 Chronische HBV-Infektion.....	16
1.3 Impfstoffe und Therapien gegen Hepatitis B.....	19
1.4 Virus-ähnliche Partikel	22
1.5 HBV-basierte VLPs	24
1.6 Translocation motif (TLM)	26
1.7 Alternative Immunisierungsrouten.....	28
1.8 Ziel des Projektes	29
2 Material	32
2.1 Zellen	32
2.1.1 Prokaryotische Zellen	32
2.1.2 Eukaryotische Zellen.....	32
2.1.3 Murine primäre Zellen	33

2.2 Mäuse	33
2.3 Plasmide	33
2.4 Oligonukleotide	34
2.5 Antikörper.....	35
2.5.1 Antikörper für Western Blot, Immunfluoreszenz und Histologie	35
2.5.2 Antikörper für FACS.....	36
2.5.3 Antikörper für ELISA	36
2.6 Größenmarker.....	36
2.7 Enzyme	37
2.8 Proteaseinhibitoren	37
2.9 Chemikalien	38
2.10 Verbrauchsmaterial.....	41
2.11 Puffer	43
2.11.1 Allgemeine Puffer.....	43
2.11.2 Puffer für Äkta.....	44
2.11.3 Puffer für Reinigung von Inclusion Bodies	45
2.12 Lösungen	45
2.13 Zellkulturmedien.....	46
2.14 Kits.....	46
2.15 Geräte	47
2.15.1 Chromatografieanlagen und Säulen	47
2.15.2 Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie	47
2.15.3 PCR-Cycler.....	48
2.15.4 Durchflusszytometrie	48
2.15.5 Elektrophorese.....	48
2.15.6 Zentrifugen.....	48
2.15.7 Photometer	49

2.15.8 Mikroskopie.....	49
2.15.9 pH-Meter	49
2.15.10 Zellaufschluss	49
2.15.11 Geräte zur Bildgebung von Western blots.....	50
2.15.12 Inkubatoren, Schüttler und Heizblöcke.....	50
2.15.13 Kryomikrotom	51
2.15.14 <i>In-vivo</i> -Imaging.....	51
2.15.15 Andere Geräte.....	51
2.15.16 Software	51
3 Methoden	53
3.1 Zellbiologische Methoden	53
3.1.1 Prokaryotische Zellkultur.....	53
3.1.2 Eukaryotische Zellkultur	53
3.1.3 Primärzellkultur	53
3.1.4 <i>Ex vivo</i> Pflaster-vermittelte Hautschichtenmigration	54
3.1.5 <i>In vitro</i> HBV-Infektionsmodell.....	55
3.1.6 <i>In vitro</i> Infektionsneutralisation durch neutralisierende Antikörper	55
3.1.7 <i>In vitro</i> Zytotoxizitäts-Assay primärer, muriner Lymphozyten und Splenozyten	55
3.2 Molekularbiologische Methoden.....	56
3.2.1 Transformation kompetenter Bakterien.....	56
3.2.2 Isolation von Plasmid DNA	56
3.2.3 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	56
3.2.4 Restriktionsendonukleaseverdau	56
3.2.5 Agarosegelelektrophorese	57
3.2.6 DNA-Extraktion aus Agarosegelen	57
3.2.7 Dephosphorylierung von Vektor-DNA.....	57

3.2.8	Ligation von DNA	57
3.2.9	DNA-Sequenzierung und Analyse	57
3.2.10	Polymerasekettenreaktion (PCR)	58
3.2.11	Kolonie-PCR	58
3.2.12	Transfektion	58
3.2.13	Klonierung von pRSET_mSA_preS1_preS2 zur Expression von mSA_preS1/2	58
3.3	Proteinbiochemische Methoden	59
3.3.1	Produktion rekombinanter Proteine	59
3.3.2	Zellaufschluss	59
3.3.3	Reinigung von <i>Inclusion Bodies</i>	59
3.3.4	Chromatografie	60
3.3.5	Assemblierung von TLMcore zu TLMcapsiden	62
3.3.6	LPS-Entfernung aus gereinigten Proteinen	62
3.3.7	SDS-PAGE	62
3.3.8	Western Blot	63
3.3.9	Indirekte Immunfluoreszenz (IF)	64
3.3.10	Sucrose-Dichte-Gradienten-Zentrifugation	64
3.3.11	Refraktometrie	65
3.3.12	Dialyse	65
3.3.13	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	65
3.3.14	Sterilfiltration	66
3.3.15	Aufkonzentrierung von Proben	66
3.3.16	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	66
3.3.17	Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR)	66
3.3.18	Mikrotomie	67
3.3.19	Protein- <i>labeling</i> mit sulfo-NHS-Cy7	67

3.4 Immunologische Methoden	68
3.4.1 FACS-Analyse	68
3.4.2 Epitop-Kartierung	69
3.4.3 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	69
3.5 <i>In vivo</i> Experimente	70
3.5.1 <i>In vivo</i> -Imaging	70
3.5.2 Immunisierung von Mäusen	70
3.5.3 Blutentnahme und Serumaufbereitung	72
3.5.4 Entnahme von Lymphknoten, Milz und Haut	72
4 Ergebnisse	74
4.1 Produktion von mSA_preS1/2 als Antigen und zellpermeablen HBVcapsiden als Träger	74
4.1.1 Konstruktion von mSA_preS1/2	74
4.1.2 Reinigung von mSA_preS1/2	75
4.1.3 Produktion und Reinigung von TLMcapsiden und Δ TLMcapsiden	76
4.2 Trägercapside können mSA_preS1/2 auf ihrer Oberfläche präsentieren	79
4.3 Zellpermeable TLMcapside diffundieren durch Zellmembranen und komplette Gewebsschichten <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	82
4.3.1 Beladene und unbeladene TLMcapside diffundieren ins Zytoplasma von Zellen <i>in vitro</i>	82
4.3.2 Längere Nachweisbarkeit der Biodistribution von TLMcapsiden in Mäusen nach intraperitonealer Injektion <i>in vivo</i>	84
4.3.3 <i>In vivo</i> Distribution von beladenen TLMcapsiden in der Leber zeigt Diffusion ins Zytoplasma von Hepatozyten	87
4.4 Humorale Immunantwort nach intraperitonealer Immunisierung von C57BL/6N Mäusen mit mSA_preS1/2-beladenen TLMcapsiden	88
4.4.1 Das α -mSA_preS1/2-Antikörperlevel von Mäusen ist nach Immunisierung mit TLMcapsiden+mSA_preS1/2 im Vergleich zu Kontrollen erhöht	89

4.4.2 Die Immunsierung von Mäusen mit freiem oder an Trägercapside gebundenem mSA_preS1/2 führt zur Bildung neutralisierender Antikörper	90
4.5 Zelluläre Immunantwort nach intraperitonealer Immunisierung von C57BL/6N Mäusen mit mSA_preS1/2-beladenen TLMcapsiden	94
4.5.1 CD8 ⁺ T-Zellen von TLMcapsiden+mSA_preS1/2-immunisierten Mäusen zeigen verminderte Granzym A- und erhöhte CD107a-Level als Zeichen einer Reaktivierung	94
4.5.2 HBV-positive Hepatozyten werden <i>in vitro</i> durch TLMcapside+mSA_preS1/2-spezifische CD8 ⁺ T-Zellen eliminiert	97
4.6 Transdermale und oral-mukosale Immunisierung von Mäusen als alternative Routen basierend auf zellpermeablen TLMcapsiden.....	99
4.6.1 mSA_preS1/2-beladenene TLMcapside migrieren durch die Haut von Mäusen <i>ex vivo</i>	99
4.6.2 Induktion einer humoralen Immunantwort nach transdermaler oder oral-mukosaler Immunisierung ist durch TLMcapside möglich	100
4.6.3 Transdermale und oral-mukosale Immunisierung mit beladenen TLMcapsiden führt zur Produktion neutralisierender Antikörper	104
4.6.4 Nach oraler und transdermaler Immunisierung von Mäusen werden HBV-positive Hepatozyten <i>in vitro</i> durch TLMcapside+mSA_preS1/2-spezifische CD8 ⁺ T-Zellen eliminiert	106
5 Diskussion	110
5.1 Herstellung von mSA_preS1/2-beladenen TLMcapsiden	111
5.2 TLMcapside diffundieren durch Zellmembranen und Gewebeschichten.....	113
5.3 Verbesserte humorale Immunantwort nach Vakzinierung mit beladenen TLMcapsiden	115
5.4 Verbesserte zelluläre Immunantwort nach Vakzinierung mit beladenen TLMcapsiden	117
5.5 Transdermale und orale Vakzinierung als alternative Routen basierend auf beladenen TLMcapsiden.....	119

5.6 Schlussfolgerung und Ausblick	121
6 Literatur	122
7 Abbildungsverzeichnis	147
8 Abkürzungsverzeichnis.....	149
9 Danksagung	152
10 Veröffentlichungen.....	153
Eidesstattliche Erklärung	155

1 Einleitung

1.1 Hepatitis-B-Virus (HBV)

1.1.1 Entdeckung

Im Jahre 1963 entdeckte der amerikanische Arzt Baruch Samuel Blumberg ein bis dato unbekanntes Antigen im Serum von australischen Ureinwohnern [1,2]. Dieses Antigen wurde zunächst als *Australia antigen* (AuAg) bezeichnet und Ende der 1960er Jahre als Verursacher der sogenannten Serum Hepatitis identifiziert [3,4]. Zu dieser Zeit war allerdings weitestgehend unklar, um was genau es sich beim AuAg handelte. Für die erste, strukturelle Aufklärung sorgte David S. Dane im Jahr 1970. Dieser entdeckte im Zuge seiner Untersuchungen zu AuAg-Immunkomplexen mithilfe der Elektronenmikroskopie (EM) Virus-ähnliche Partikel (*virus-like particles*) mit einem Durchmesser von 42 nm. In Würdigung seiner Verdienste wurden die viralen Partikel als „Dane-Partikel“ bezeichnet [5]. Später erkannte man, dass es sich beim identifizierten *Australia Antigen* um das Oberflächenantigen des Hepatitis-B-Virus (HBV) handelte, welches deshalb als HBsAg (*Hepatitis B surface antigen*) bezeichnet wurde. Im Jahr 1976 wurde Blumberg, zusammen mit D. C. Gajdusek, schließlich der Nobelpreis „für ihre Entdeckungen bezüglich neuer Mechanismen für den Ursprung und die Ausbreitung infektiöser Erkrankungen“ im Bereich „Physiologie oder Medizin“ verliehen [4].

1.1.2 Taxonomie

Das Hepatitis-B-Virus zählt zur Familie der *Hepadnaviridae*, welche sich wiederum in zwei Gattungen teilt – die *Orthohepadnaviridae* der Säugetiere und die *Avihepadnaviridae* der Vögel. Zur Gattung der *Orthohepadnaviridae* zählen das humane (HBV), das Schimpansen- (ChHBV), das Gibbon- (GiHBV), das Orang-Utan- (OuHBV), das Gorilla- (GoHBV) und das Wollaffen- (WMHBV) Hepatitis-B-Virus. Weiterhin gehören das Waldmurmeltier- (WHV), das Erdhörnchen- (GSHV) und das arktische Ziesel-Hepatitis-Virus (ASHV) zu dieser Gattung [6]. Kürzlich wurde ein weiterer Vertreter der *Orthohepadnaviridae* in Fledermäusen identifiziert. Das Fledermaus-Hepatitis-Virus weist eine Verwandtschaft zum HBV auf und könnte einen antezessorischen Vorgänger des Primaten Hepadnavirus darstellen [7,8].

Zu den Vertretern der *Avihepadnaviridae* zählt man unter anderem das Enten-Hepatitis-B-Virus (DHBV), das Reiher-Hepatitis-B-Virus (HHBV) sowie das Schneegans-Hepatitis-B-Virus (SGHBV) [6,9]. Sämtlichen Mitgliedern der *Hepadnaviridae* ist gemein, dass sie hepatotrop, höchst Wirts-spezifisch und Auslöser akuter oder chronischer Infektionen sind

[10]. Das humane HBV spaltet sich aufgrund seiner genetischen Variabilität in insgesamt acht verschiedene Genotypen auf, welche in die Genotypen A bis H unterteilt sind und unterschiedlichen geografischen Verteilungen unterliegen (**Abbildung 1**). Geografisch am breitesten verteilt ist der Genotyp D [11]. Zusätzlich zu den Genotypen A bis H wurden zwei neue, mutmaßliche Genotypen in Vietnam, Japan und Laos identifiziert, welche die vorläufigen Bezeichnungen I und J tragen [12–14]. Die verschiedenen Genotypen unterscheiden sich nicht nur in der geografischen Ausprägung, sondern auch in ihrer Pathogenität und der Tendenz zur Entwicklung chronischer Infektionen und hepatozellulärer Karzinome (*hepatocellular carcinoma*, HCC) [15,14,16]. Zusätzlich unterscheidet man noch neun verschiedene, serologische Subtypen, welche man anhand der Unterschiede in der Aminosäuresequenz der S-Domäne der Oberflächenproteine gruppiert: ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4q, adr_q+ und adr_q- [16].

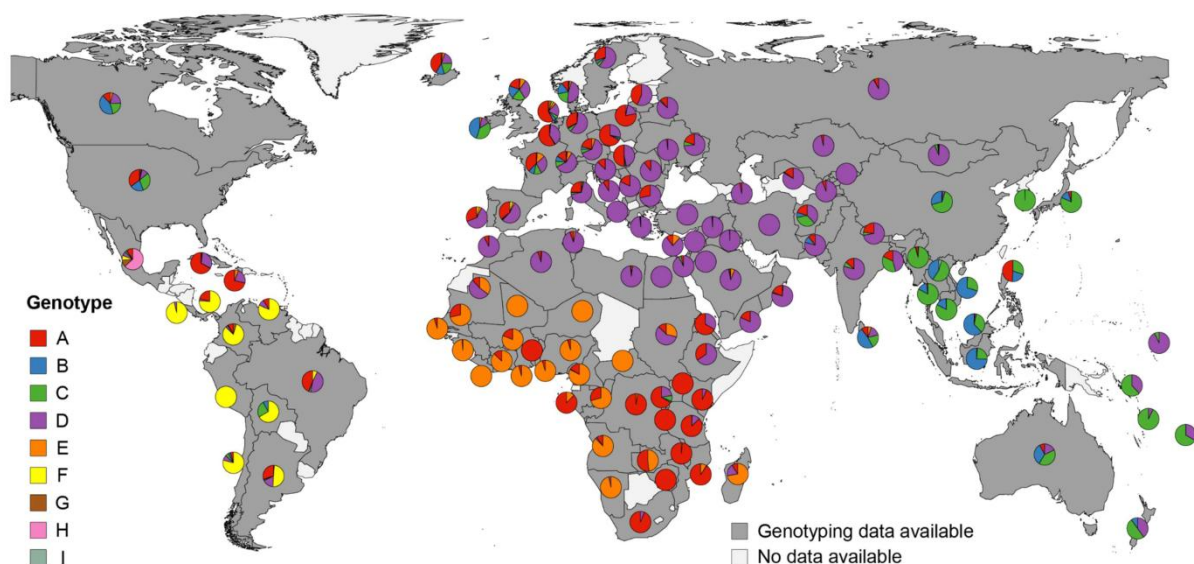


Abbildung 1: Geografische Verteilung der HBV Genotypen. Die Abbildung zeigt die weltweite Verteilung der Genotypen A-I des Hepatitis-B-Virus. (Übernommen von [17])

1.1.3 Struktur

Das Hepatitis-B-Virus gehört zu den kleinsten der bekannten DNA-haltigen und umhüllten Tierviren. Das infektiöse Virion weist einen hydrodynamischen Durchmesser von 42-45 nm auf, ist behüllt und beinhaltet eine Einzelkopie des viralen DNA-Genoms, welches über den (-)-Strang kovalent an die virale Polymerase gebunden ist [18–21,5]. Die DNA befindet sich innerhalb des ca. 30 nm großen, ikosaedrischen Nukleocapsids, welches aus 120 Dimeren des Core-Proteins gebildet wird (T=4 Symmetrie; sogenannte unbehüllte *naked capsids*

kommen auch in der T=3 Symmetrie vor). Das Capsid ist wiederum von einer Lipid-Doppelschicht umgeben, welche drei verschiedene virale Oberflächenproteine an sich trägt und die Virushülle bildet [19]. Die Lipidhülle beinhaltet etwa 400 Moleküle des HBV Oberflächenproteins (*HBV surface antigen*, HBsAg), welches aus dem kleinen (*small*, SHBs, S-Domäne), mittleren (*middle*, MHBs, S- und PreS2-Domäne) und großen (*large*, LHBs, S-, PreS1- und PreS2-Domäne) Oberflächenprotein im Verhältnis 4:1:1 (S:M:L) aufgebaut ist [22,10]. Neben infektiösen Dane-Partikeln finden sich auch noch zwei andere Formen viraler Partikel im Serum HBV-infizierter Patienten: die Filamente und die Sphären (**Abbildung 2**) [23]. Diese beiden Partikelformen liegen je nach Genotyp etwa im 10.000-fachen Überschuss im Vergleich zu den infektiösen Partikeln vor, bestehen ausschließlich aus den viralen Oberflächenproteinen und Lipiden des Wirtes und beinhalten keine DNA [24]. Die Sphären besitzen in etwa eine Größe von 17-25 nm, während Filamente unterschiedliche Längen, aber einen Durchmesser von etwa 20 nm aufweisen [2]. Welche genaue Funktion diese subviralen Partikel erfüllen, ist umstritten. Aufgrund ihres hohen Aufkommens wird allerdings davon ausgegangen, dass sie vor allem dazu dienen, neutralisierende, HBsAg-spezifische Antikörper im Serum infizierter Patienten abzufangen, um den infektiösen Partikeln den Weg zu suszeptiblen Zielzellen zu ebnen [25]. Weiterhin wurde beobachtet, dass die subviralen Partikel in der Lage sind, die intrazelluläre Replikation und Genexpression zu fördern sowie die Bildung einer immunologischen Toleranz und Festigung einer persistenten Infektion zu unterstützen [26,24,23].

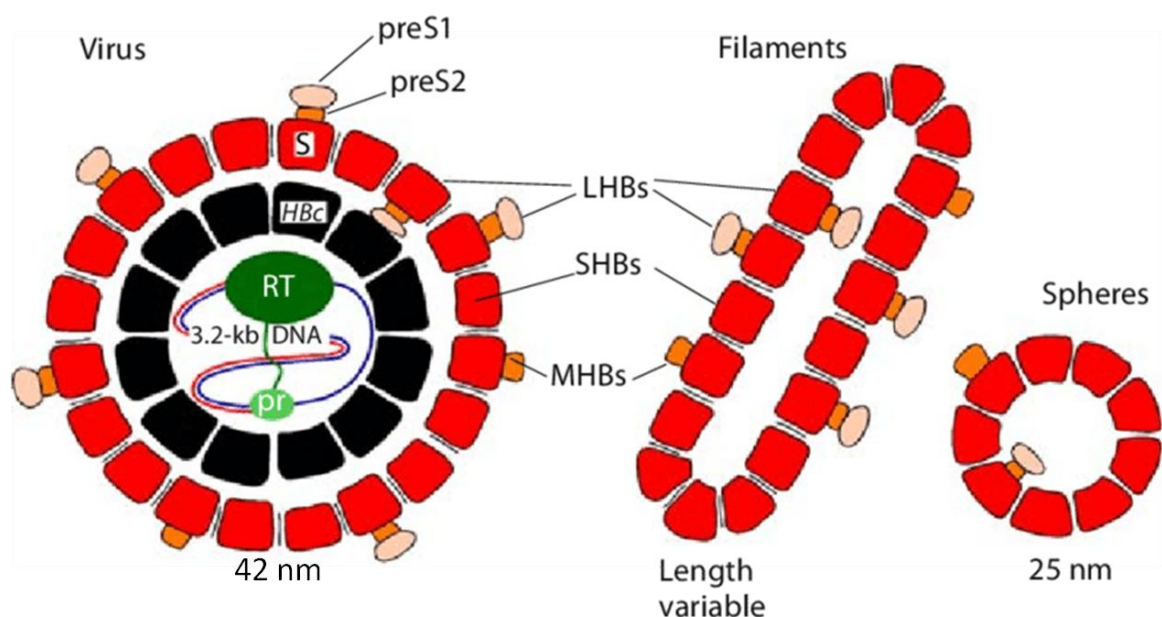


Abbildung 2: Struktur des Hepatitis-B-Virus und der subviralen Partikel. Die etwa 42 nm großen, infektiösen Dane-Partikel (links) beinhalten das DNA-Genom, welches vom Nukleocapsid, gebildet durch Core-Proteine, umgeben ist. Das Capsid wird von der Virushülle umgeben, welche aus einer Wirtslipiddoppelschicht besteht, in

der die drei Oberflächenproteine SHBs, MHBs und LHBs eingebettet sind. Diese bauen sich wiederum aus den Domänen S, PreS2 und/oder PreS1 auf. Die subviralen Partikel (mittig und rechts) bestehen aus den Oberflächenproteinen und beinhalten keine DNA. Während die Filamente (mittig) eine variable Länge aufweisen, besitzen die Sphären (rechts) einen Durchmesser von etwa 17-25 nm (modifiziert von [27]).

1.1.4 S, PreS1 und PreS2

Die Oberflächenproteine, welche aus den Domänen PreS1 (108 oder 119 AS), PreS2 (55 AS) und S (226 AS) gebildet werden, werden in einem offenen Leserahmen abgelesen, welcher durch drei AUG Startcodons für das LHBs, MHBs und SHBs unterteilt ist [19]. Die Oberflächenproteine weisen teilweise Glykosylierungen auf. So befindet sich eine N-Glykosylierungsstelle am Asparagin-146 der S-Domäne. Da S in allen Oberflächenproteinen vorliegt, wird diese Seite auch teilweise von allen drei Proteinen genutzt [28,29]. Weiterhin existiert eine Glykosylierungsstelle am Asparagin-4 des PreS2, welche in MHBs, aber nicht in LHBs genutzt wird, sowie eine Position für O-Glykosylierung am Threonin-37 des PreS2, welche sowohl am MHBs als auch teilweise am LHBs O-glykosyliert ist. Nur der Genotyp A besitzt kein Threonin an dieser Stelle und bildet damit die Ausnahme [30]. Alle Oberflächenproteine sind über die S-Domäne in die Membran eingebettet, welche die Transmembranregionen TM1 (AS 8-22) und TM2 (AS 80-98) besitzt. Am C-Terminus sitzt mindestens eine weitere (TM3) oder zwei weitere Transmembranregionen (TM3 und TM4) (**Abbildung 3**) [31,32]. Der N-Terminus (AS 1-7) sowie der Loop (AS 99-169) zeigen während der Synthese der Oberflächenproteine am endoplasmatischen Retikulum (ER) ins ER-Lumen, während die Domäne zwischen AS 23 und 79 ins Zytoplasma zeigt. Dadurch kann die Glykosylierungsstelle am Asparagin-146 durch die im ER-Lumen vorkommende N-Glykosyltransferase N-glykosyliert werden. Dieser Loop beinhaltet die „a“ Determinante, welche das Hauptepitop des HBsAg zur Induktion der humoralen Immunantwort darstellt. Durch die Lokalisation der „a“ Determinante in Richtung des Lumen stülpt sich dieser Loop im Zuge der Ausknospung des Virus nach außen und sitzt demzufolge auf der Außenseite des gereiften Virus [33,34,21,35]. Weiterhin besitzt die PreS1 Domäne eine Reihe erwähnenswerter Eigenschaften: Das Glycin an AS 2 des PreS1 ist myristoyliert, was offenbar entscheidend für die Anlagerung beim Eintritt in die Zielzelle während einer Infektion ist [36,37]. Weiterhin zeigt LHBs eine duale Membrantopologie. In etwa 50% der Fälle führt eine postrtranslationale Translokation dazu, dass der PreS1- und PreS2-Anteil des LHBs ins Lumen des ER zeigt [38–42]. Zeigt LHBs ins Zytoplasma bzw. ins Innere des Virus, so ist PreS1 unter anderem mitverantwortlich für die Assemblierung des Virions und PreS2 kann an die Proteinkinase C (PKC) binden und diese aktivieren, um die *c-raf-1/ERK2 (rapidly accelerated fibrosarcoma-1/extracellular signal-regulated kinase 2)* Signalkaskade hin zu

AP1 (*activator protein 1*) und NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*) einzuleiten [43]. Liegt LHBs in der zweiten Topologie vor und präsentiert PreS1 damit nach außen, so übernimmt es eine kritische Rolle für die Infektion des Virions [44]. Die Region innerhalb des PreS1, welche für die Infektion eine Rolle zu spielen scheint, liegt in den ersten 78 AS des N-Terminus [44]. Dazu zählt die Myristoylierung an AS 2, die sogenannte essentielle Region (AS 9-15) [45], die akzessorische Region (AS 28-48) [46] und eine Region innerhalb der AS 49-78 [47]. Eine wichtige Komponente der PreS2 Domäne stellt das sogenannte *translocation motif* (TLM) dar (näher erläutert in 1.6). Hierbei handelt es sich um eine amphipathische α -Helix zwischen AS 41 und 52, welche zellpermeable Eigenschaften besitzt und beim Eintritt des Nukleocapsids aus dem Endosom ins Zytoplasma zu Beginn einer Infektion eine entscheidende Rolle übernimmt [48,49].

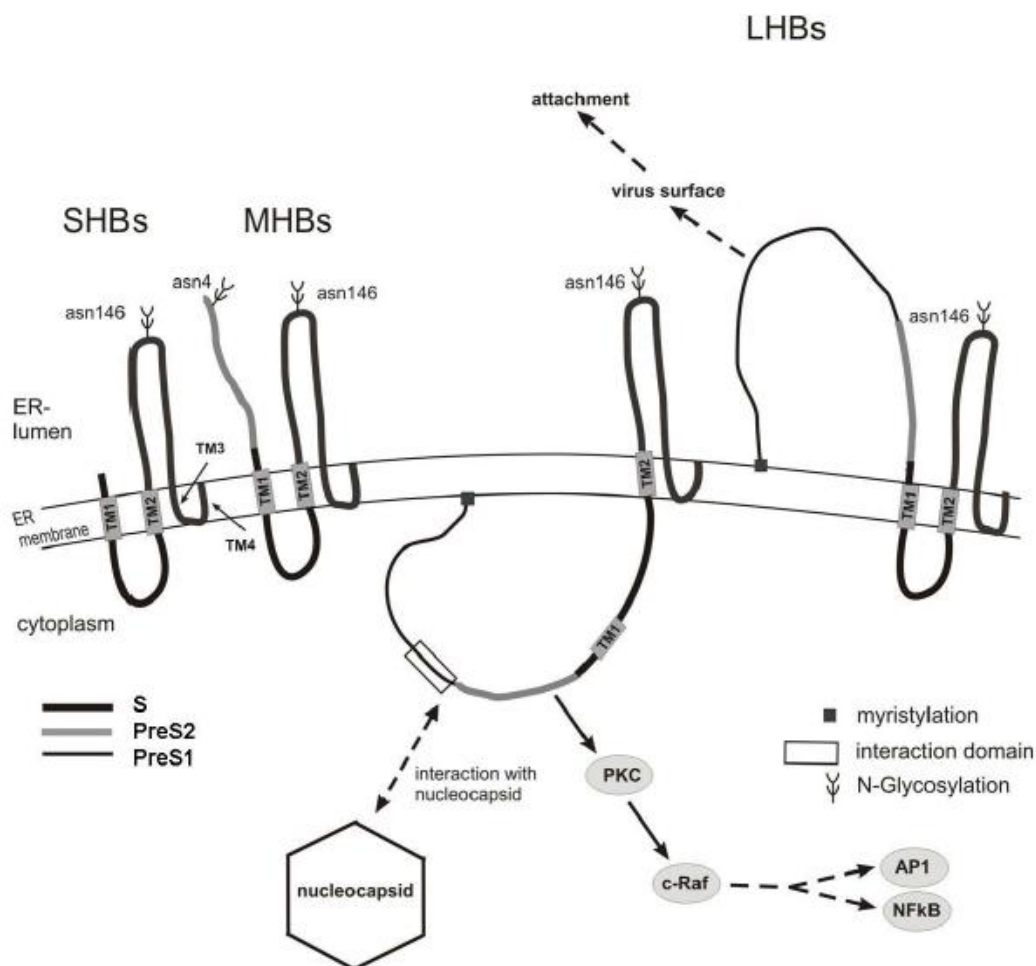


Abbildung 3: Schematische Darstellung des HBsAg. Die S-Domäne besitzt vier Transmembranregionen und liegt in allen drei Proteinen vor, PreS2 nur in MHBs und LHBs und PreS1 ausschließlich in LHBs. LHBs besitzt zwei unterschiedliche Topologien. Neben der Orientierung zur zytosolischen Seite, welche für den Kontakt mit dem Nukleocapsid und Interaktion des PreS2 mit der Proteinkinase C entscheidend ist, kann LHBs auch in Richtung des ER Lumen orientiert sein. In diesem Fall wird LHBs im gereiften Virion auf der Oberfläche

präsentiert und ist für die Infektion von Bedeutung. Die S-Domäne hat eine Glykosylierungsseite am Asparagin-146 und PreS2 am Asparagin-4, wobei letztere nur von MHBs genutzt wird. Übernommen aus [19].

1.1.5 HBV Core und Capsid

Das Core-Protein des HBV bildet die Untereinheit des Viruscapsids (**Abbildung 4**). Je nach Genotyp variiert seine Größe zwischen 183 und 185 AS [50]. Das Core-Protein lässt sich in zwei Bereiche innerhalb der Aminosäuresequenz unterteilen. Der je nach Genotyp 149 bzw. 151 AS lange N-Terminus bildet die Assemblierungs-Domäne. Dieser Teil ist für die Selbstassemblierung der Core-Monomere zu Capsiden essentiell. Der 34 AS lange C-Terminus hingegen ist für die Assemblierung entbehrlich, allerdings ist er am Verpacken des Prägenom-Reverse-Transkriptase-Komplexes beteiligt. Aus diesem Grund wird er als *Packaging*-Domäne bezeichnet [50]. Kristallstrukturanalysen des Core-Proteins ergaben, dass es überwiegend aus α -Helices besteht. Die ersten 12 AS des N-Terminus beginnen noch mit einer irregulären Struktur, gefolgt von der ersten Helix (α_1) von AS 13-17 und einer zweiten (α_2) von AS 27-43, welche nach AS 37 abknickt. Die Struktur des Core-Proteins wird maßgeblich von einer Haarnadelschleife dominiert, welche aus den Helices α_3 (AS 50-73) und α_4 (AS 79-110) besteht. Die α_4 -Helix ist nach AS 90 abgeknickt, sodass sie von α_3 abgespreizt wird. Der C-terminale Teil besitzt die α -Helix α_5 (AS 112-127), welcher ein irregulärer Prolin-Loop (AS 128-136) und die C-terminale Sequenz von AS 137-142 bzw. 143 folgt. Die Haarnadelschleife bildet das sogenannte *Spike*, eine aus Sicht des assemblierten Capsids nach außen gerichtete spitze Struktur, welche die hauptimmundominante Region zwischen AS78-AS83 beinhaltet und bei Infektionen als B-Zellepitop zu einer starken Antikörper-Antwort führt [51–53]. Der erste Schritt zur Assemblierung der Core-Monomere zu vollständigen Capsiden besteht in der Bildung von Core-Homodimeren über Disulfidbrücken am Cystein-61 [54,55]. Zwar wurde beobachtet, dass eine Interaktion mit Chaperonen in größeren Core-Oligomeren stattfindet – der genaue Mechanismus der Assemblierung ist jedoch noch weitestgehend unklar [56]. Es wird angenommen, dass nach der Dimerisierung partielle Core-Nuklei gebildet werden, welche sich nach und nach mit Untereinheiten zusammenfügen und schließlich das ikosaedrische Capsid bilden [57]. Nach bakterieller Expression von Core assemblieren zwei verschiedene Typen von Capsiden. Man unterscheidet sie anhand der Triangulationszahl (Kennzahl, welche die Größe und Komplexität eines ikosaedrischen Capsids bestehend aus Vielfachen von je zwanzig Protein-Trimer-Flächen angibt) oder T-Symmetrie, aus der sich die ikosaedrische Geometrie des Capsids ergibt. Diese bestehen aus entweder 90 Dimeren (180 Monomere, T=3 Symmetrie) oder 120 Dimeren (240 Monomere, T=4 Symmetrie) [34]. Dabei zeigen T=3 Capside einen Durchmesser von etwa 32 nm, T=4 Capside einen Durchmesser von etwa 36 nm [58]. Zwar kommen beide T-Symmetrien in der Natur vor, die überwiegende Mehrheit, nämlich 95%, der

untersuchten Capside in Seren infizierter Patienten besitzen aber eine T=4 Symmetrie [34,59].

Bei der *in vitro* Assemblierung von Core stehen die Parameter Proteinkonzentration, Ionenstärke und Temperatur im Vordergrund. Bei der Proteinkonzentration ist nach derzeitigem Stand vor allem die Konzentration freier Core-Dimere im Equilibrium, die sogenannte pseudo-kritische Konzentration, für eine Assemblierung wichtig. Erreicht die Konzentration der Dimere nach steter Assemblierung die kritische Konzentration, so erreicht die Menge assemblierter Capside ein Plateau [57]. Da die Assemblierung auch von der Ionenstärke abhängt, konnte beobachtet werden, dass eine Erhöhung der Salzkonzentration möglicherweise über Konformationsänderungen auf Seiten des Core bzw. Capsids zur *in vitro* Assemblierung führen kann [60,61]. Ob sich *in vitro* eher eine Triangulationszahl von 3 oder von 4 ergibt, hängt neben der Ionenstärke und Konzentration auch von Mutationen und Deletionen ab. Bei Core-Proteinen, welche C-terminal bis AS 140 verkürzt wurden und die Assemblierungsdomäne intakt blieb, wurden 85% der Capside mit einer T=3 Symmetrie gefunden. Weitere C-terminale Verkürzung führt schließlich jedoch zu unvollständiger oder ausbleibender Assemblierung [62,63]. Geringe Verkürzung des C-Terminus führt hingegen zur Bildung von überwiegend T=4-symmetrischen Capsiden, bei einer Länge von 149 AS sogar zu 95% dieser größeren Capside [63,64].

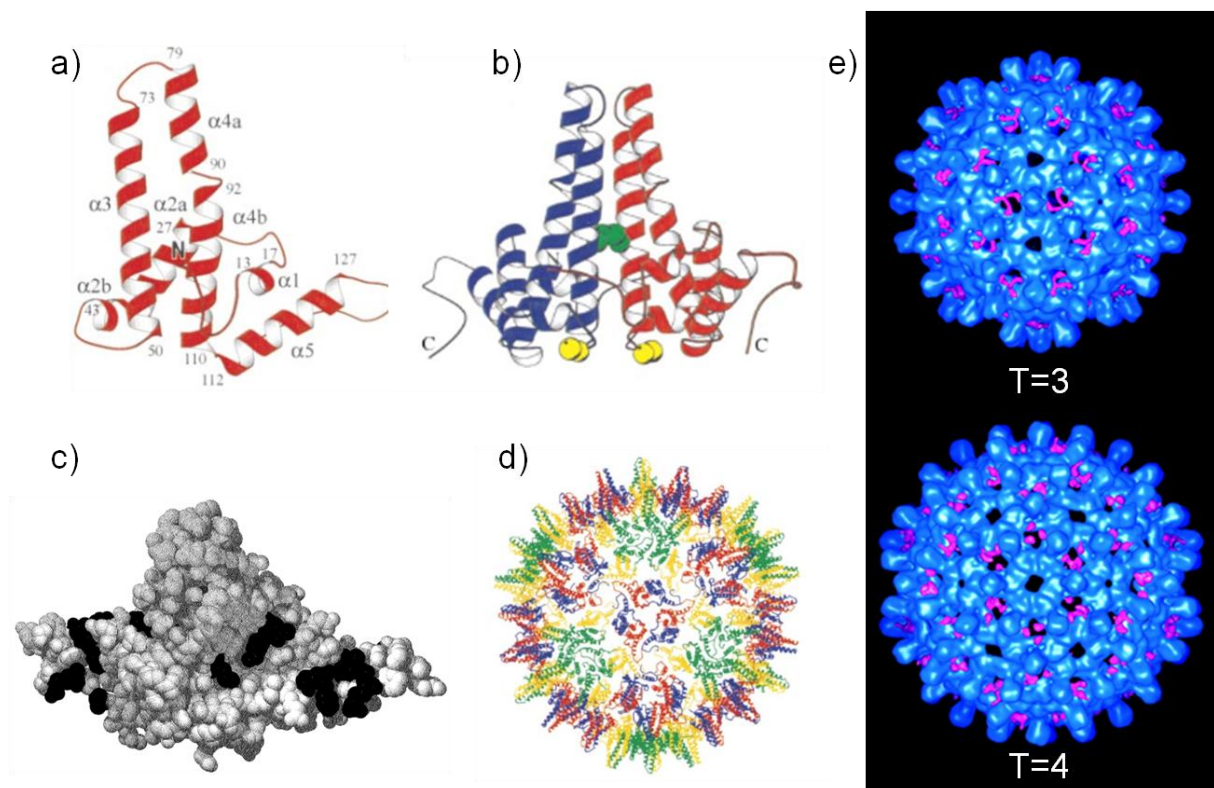


Abbildung 4: Core-Protein und Capsid des HBV. (a) Das aus 5 α-Helices bestehende Core-Monomer besitzt eine helikale Haarnadelschleife gebildet aus α3 und α4 [53]. (b) Ein Core-Dimer mit Disulfidbrücke am Cys-61 (grün) [53]. (c) Kristallstruktur eines C-terminal verkürzten Core-Dimers mit nach oben orientiertem *Spike*

(modifiziert nach [50]). (d) Vollständig assembliertes Capsid [53]. (e) Cryo-EM Rekonstruktion eines T=3 und T=4 Capsids (modifiziert nach [65])

1.1.6 Genom

Das ca. 3,2 kb große Genom des Hepatitis-B-Virus besitzt lediglich vier offene Leserahmen (*open reading frames*, ORF), welche äußerst kompakt organisiert sind (**Abbildung 5**). Mehr als die Hälfte der Nukleotide innerhalb des Genoms werden daher für mehr als einen ORF verwendet [20]. Das Genom besteht aus partiell-doppelsträngiger rcDNA (*relaxed circular DNA*) mit einem kompletten, negativen Kodierungsstrang und einem unvollständigen, positiven nicht-kodierenden Strang [66–68]. Das 5'-Ende des negativen Strangs ist kovalent mit einer viralen RNA-abhängigen DNA-Polymerase über Phosphotyrosin gebunden [69,23]. Das 5'-Ende des positiven Strangs hingegen besitzt eine kleine, kovalent gebundene Abfolge von RNA-Oligonukleotiden, die als Primer für die Positivstrangsynthese dienen [70,23]. Die vier ORFs des Negativstrangs kodieren für die virale Polymerase (P), das Pre-Core- (HBeAg) und das Core-Protein (HBcAg), das regulatorische X Protein (HBx) und die drei Oberflächenproteine (HBsAg) SHBs, MHBs und LHBs [19]. Der ORF der Polymerase überlappt mit dem 3'-Ende des Core-Gens, des gesamten Gens der Oberflächenproteine sowie mit dem 5'-Ende des X-Gens [71,72]. Die sogenannten *directed repeats* DR1 und DR2 dienen der Replikation der DNA und der Genom-Zirkularisation und scheinen eine Rolle bei der Integration viraler DNA zu spielen [72,73]. Im Zuge der Infektion einer Zelle mit HBV wird das virale Genom zum Nukleus transportiert und der unvollständige Positivstrang vermutlich durch die zelleigene DNA-Reparaturmaschinerie vervollständigt. Durch diesen Vorgang entsteht die kovalent-geschlossene, zirkuläre DNA (*covalently closed circular DNA*, cccDNA) [74,75]. Diese dient als Vorlage der prägenomischen RNA (pgRNA) und der subgenomischen RNA-Transkripte, welche durch die Wirts-eigene RNA-Polymerase II transkribiert werden und mit einem 5'-Cap versehen sowie polyadenyliert werden [70,19]. Pre-Core sowie Core und die virale Polymerase entstehen durch Translation der 3,5 kb mRNA. Die Translation der 2,4 kb mRNA generiert das große Oberflächenprotein LHBs, während das heterogene 5'-Ende der 2,1 kb mRNA zur Produktion von MHBs und SHBs führt. Die kurze 0,7 kb mRNA codiert für das HBx Protein [72,76,66]. Die pgRNA ist das einzige Transkript, das für die Genomreplikation erforderlich ist. Neben ihrer Funktion als bizistronische Vorlage für Core und Polymerase ist sie ebenso die RNA, welche für die Umwandlung zur Vorläufer-DNA in die gebildeten Capside verpackt wird [77]. Die Haarnadelstruktur ϵ am 5'-Ende vermittelt diese Verpackung und wird deshalb auch als *RNA encapsidation signal* ϵ bezeichnet [70].

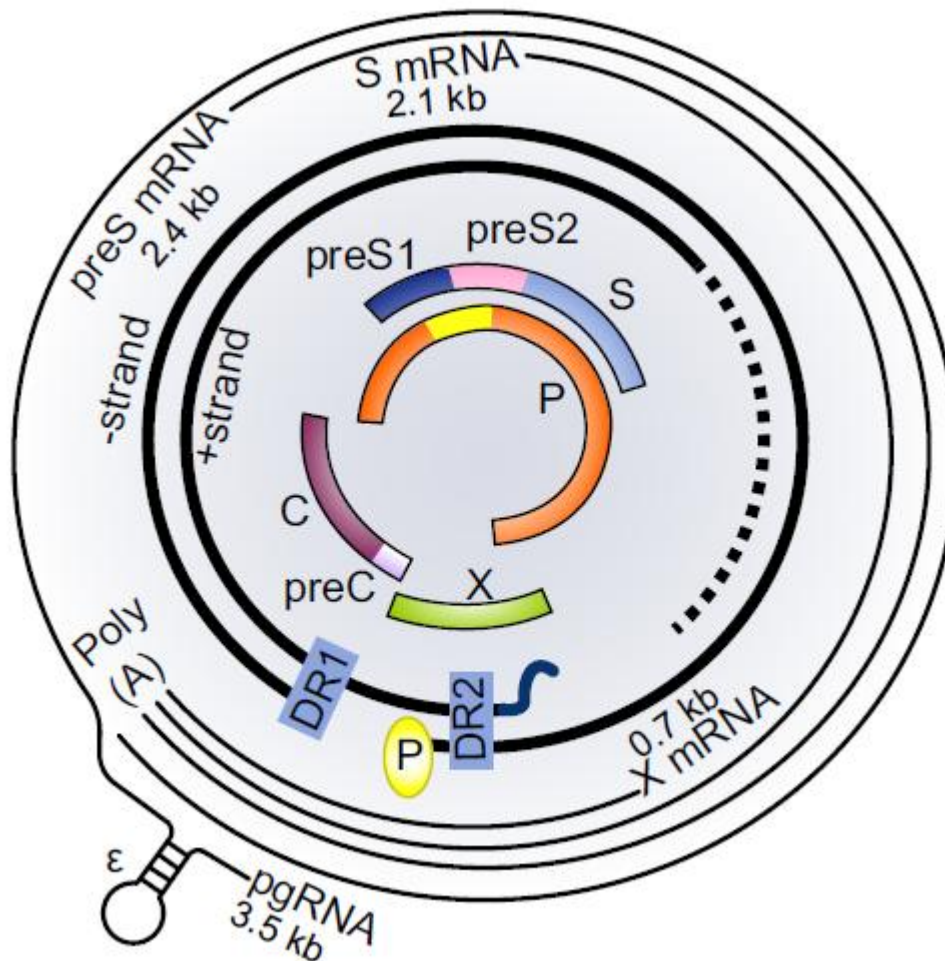


Abbildung 5: Organisation des Genoms des Hepatitis-B-Virus. Der ORF der Polymerase (P) überlappt vollständig mit dem ORF von PreS1/PreS2/S und teilweise mit Pre-Core und Core (preC/C) sowie mit dem X ORF. In schwarz dargestellt ist das partiell-doppelsträngige DNA-Genom mit kovalent-gebundener Polymerase am 5'-Ende des (-)-Strangs sowie dem unvollständigen 3'-Ende des (+)-Strangs, mit den RNA-Oligonukleotiden am 5'-Ende. Die *directed repeats* (DR1 und DR2) dienen der Replikation der DNA und der Genom-Zirkularisation. Als dünne, schwarze Linien sind außen die vier RNA-Typen des cccDNA-Templates dargestellt: Die 3,5 kb pgRNA für Core und Polymerase sowie Genomreplikation, zusammen mit der Haarnadelstruktur ϵ ; die 2,4 kb preS mRNA für LHBS; die 2,1 kb S mRNA für MHBS und SHBS; sowie die 0,7 kb X mRNA für das HBx Protein. Nicht gezeigt ist die 3,5 kb Pre-Core RNA für die Expression von HBeAg [72].

1.1.7 HBV Lebenszyklus

Eine gemeinsame Eigenschaft aller Hepadnaviren ist ihre hohe Speziespezifität – so ist auch das Hepatitis-B-Virus ausschließlich in der Lage, Menschen, Schimpansen und das Spitzhörnchen *Tupaia belangeri* zu infizieren. Eine Infektion von Mäusen oder Ratten ist auf natürlichem Wege hingegen nicht möglich [78,79]. Die parenchymalen Hepatozyten der Leber stellen die primären Wirts- und Zielzellen des Hepatitis-B-Virus dar [80]. Das Virus erlangt dabei zunächst über Läsionen der Haut oder Schleimhäute Zugang zu den

Blutgefäßen, um dann mittels Lebersinusoide über den Disse-Raum in die Leber zu gelangen. Dort kommt es schließlich in Kontakt mit den infizierbaren Hepatozyten [10]. Die Bindung des Virus an die Hepatozyten erfolgt zunächst Energie-unabhängig und unspezifisch über Kohlenhydratseitenketten von Heparinsulfat-Proteoglykanen auf der Plasmamembran [81,82]. Als ein essentieller, spezifischer Rezeptor für den Eintritt des Virus in die Zelle wurde das Natrium-abhängige Taurocholatcotransport Polypeptid (*sodium-taurocholate cotransporting polypeptide; NTCP*) identifiziert, welches die Rezeptorbindedomäne von PreS1 des LHBs bindet (**Abbildung 6**) [45]. Ob neben NTCP weitere Co-Rezeptoren bei der Aufnahme des Virus eine Rolle spielen, ist noch Gegenstand aktueller Forschung. Die Internalisierung des Virus geschieht anschließend über Rezeptor-vermittelte Endozytose. Innerhalb des Endosoms führt der niedrige pH-Wert und proteolytische Prozessierung dann zu einer Konformationsänderung der PreS2-Domäne, was zur Folge hat, dass das sogenannte *Translocation motif* (TLM), ein Peptid bestehend aus einer amphipathischen Helix, exponiert und demaskiert wird [83,49]. Das TLM gehört zu den membranpermeablen Peptiden und besitzt die Eigenschaft, andere Peptide oder Proteine selbst Energie- und Rezeptor-unabhängig durch zelluläre Membranen ins Zytoplasma zu überführen, wenn diese mit TLM fusioniert sind [84,48,85,86,61]. Es wird angenommen, dass das TLM während des viralen Aufnahmeprozesses im Endosom die Translokation durch die endosomale Membran ins Zytoplasma vermittelt. Die proteolytisch prozessierte Hülle dissoziiert anschließend vom Nukleocapsid [19,49]. Obwohl beobachtet wurde, dass die Anwesenheit des TLM essentiell für eine Infektion ist, gibt es auch gegenteilige Untersuchungen, welche im Schluss das TLM als entbehrlich für Infektionen ansehen [87]. Daneben existiert ein alternatives Model, in welchem das virale Nukleokapsid das Endosom verlässt, indem es zur Fusion der Virushülle mit der endosomalen Membran kommt [2]. Befindet sich das Nukleokapsid im Zytoplasma, wird es über Mikrotubuli zum Nukleus transportiert [86,88,89]. Über zwei nukleare Lokalisationssequenzen (NLS) am C-Terminus des Core-Proteins wird das Genom ins Nukleoplasma über den Kernporenkomplex transportiert, nachdem das virale Capsid im Porengeflecht zerlegt wurde [90–92]. Das virale Genom liegt beim Eintritt in den Zellkern noch als rcDNA vor, mit einem vollständigen (-)- und unvollständigen (+)-DNA-Strang, und jeweils der viralen Polymerase am 5'-Ende des (-)- und RNA-Oligonukleotiden als Primer für die (+)-Strangsynthese am 5'-Ende des (+)-Strangs. Für eine erfolgreiche Infektion muss das Genom in einer stabilen Form vorliegen, weshalb die rcDNA zu nuklearer, episomaler cccDNA (*covalently closed circular DNA*) konvertiert wird. Die cccDNA stellt das zentrale Intermediat der viralen Replikation in der Zelle dar und liegt mit etwa 30-50 Kopien pro Zelle vor [93,94]. Für die cccDNA-Synthese wird der kürzere (+)-DNA-Strang komplettiert und beide Stränge kovalent ligiert. Zusätzlich assoziiert die DNA mit Histonen, um ein episomales Minichromosom im Nukleus der

infizierten Zelle zu schaffen [19,95,96]. Die cccDNA dient einerseits als Vorlage für die Transkription der 3,5 kb pgRNA, welche daraufhin für die eigentliche virale Replikation entscheidend ist, und andererseits der Transkription der subgenomischen 0,7 kb, 2,1 kb und 2,4 kb mRNA, welche der Translation einiger der viralen Proteine dienen [19,97]. Die pgRNA wird nach der Transkription ins Zytoplasma transportiert, wo sie zunächst in die Polymerase, in das Core und das Pre-Core Protein translatiert wird. Anschließend bindet die Polymerase, welche DNA-abhängige DNA-Polymerase-, reverse Transkriptase- und RNaseH-Aktivität besitzt, an das *encapsidation signal* ϵ der pgRNA, was zur Folge hat, dass der Komplex aus Polymerase und pgRNA in aus Core-Proteinen assemblierten Capsiden verpackt wird. Über die virale, reverse Transkription, bedingt durch die Polymerase- ϵ Interaktion, wird aus der pgRNA schließlich rcDNA synthetisiert [19,50,98]. Die verbleibende pgRNA wird schließlich über die RNaseH Aktivität der viralen Polymerase degradiert [98]. Die rcDNA-haltigen und fertigen Nukleocapside können nun entweder zurück zum Nukleus transportiert werden, um erneut DNA ins Nukleoplasma zu entlassen und die Menge an synthetisierter cccDNA zu erhöhen oder sie begehen den Weg der Freilassung aus der Zelle als *naked capsids* oder vollständige Virionen. Im zweiten Fall interagieren die Nukleocapside mit den HBV-Oberflächenproteinen, welche parallel an der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) translatiert werden, um die Zelle im darauffolgenden Schritt als infektiöse Virionen zu verlassen [19]. Für die Ummantelung der Nukleocapside mit den Oberflächenproteinen interagieren die Core-Proteine des Capsids mit dem LHBs an der zytosolischen Seite des ER. Durch ein Einknospen des Nukleocapsids ins Innere des ER werden die Capside mit den Oberflächenproteinen und der Membran als Mantel umschlossen. Die viralen Partikel werden schließlich über *multivesicular bodies* (MVBs) des späten endosomalen Kompartiments entlassen, welche wiederum in ihrer Entstehung und Einbringen der Viren vom *endosomal sorting complex required for transport* (ESCRT)-Proteinkomplex abhängig sind [99,100]. Subvirale Partikel werden weiter zum Golgi-Apparat geführt, wo eine weitere Prozessierung der Oberflächenproteine stattfindet [101,102]. Die hauptsächlich aus SHBs aufgebauten subviralen Sphären verlassen die Hepatozyten über den konventionellen sekretorischen Weg, die subviralen Filamente hingegen, welche größere Mengen an LHBs besitzen, verlassen die Zelle wie virale Partikel ESCRT- und MVB-abhängig [103].

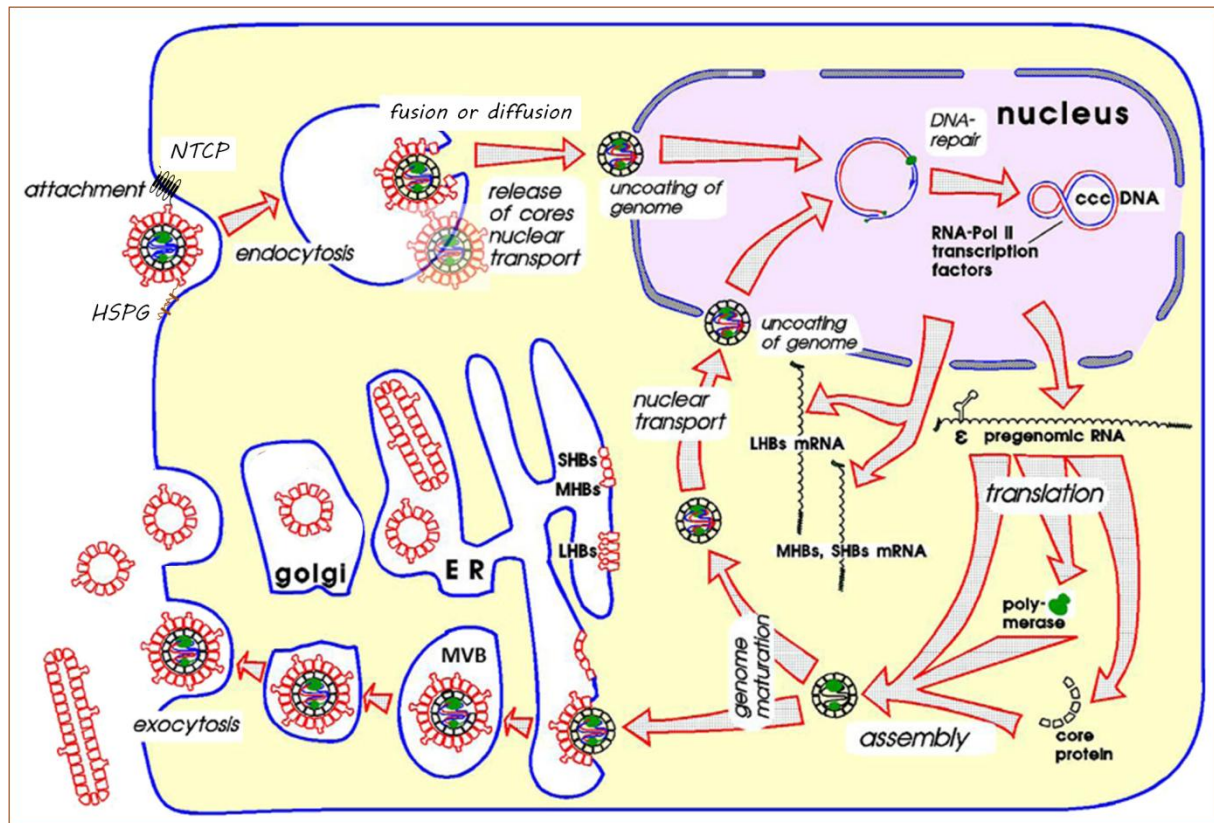


Abbildung 6: Lebenszyklus des Hepatitis-B-Virus. Das Virus bindet zunächst unspezifisch an die Heparinsulfat-Proteoglykane (HSPG) von Hepatozyten und anschließend über die Rezeptorbindedomäne von PreS1 an NTCP. Dies löst eine Rezeptor-vermittelte Endozytose aus. Das Virus verlässt das Endosom anschließend entweder durch Fusion des Mantels mit der Membran oder durch ein Demaskieren des *translocation motif*, welches das Partikel ins Zytoplasma diffundieren lässt. Das Nukleocapsid wird zum Nukleus transportiert, wo es das Genom in Form von rcDNA ins Nukleoplasma freigibt. Dort wird die rcDNA in das stabilere Minichromosom cccDNA konvertiert. Die cccDNA dient nun als Vorlage für die drei subgenomischen mRNAs sowie für die prägenomische RNA (pgRNA). Aus der pgRNA werden die Polymerase, das Core und das PreCore Protein synthetisiert. Während sich Core Proteine zu Capsiden assemblieren, bindet die Polymerase an das *encapsidation signal* ϵ der pgRNA und wird zusammen mit ihr in die Capside verpackt. Die Polymerase transkribiert die pgRNA revers in rcDNA und baut die pgRNA anschließend ab. Die fertigen Nukleocapside werden entweder zurück zum Nukleus geführt um dort ihre DNA erneut ins Nukleoplasma abzugeben und weitere cccDNA zu synthetisieren – oder sie interagieren mit den Oberflächenproteinen am endoplasmatischen Retikulum. Dabei bindet das Core der Capside mit dem LHBs an der zytosolischen Seite des ER und umschließt sich mit der Membran und den Oberflächenproteinen, um einen Mantel zu bilden. Die Partikel werden anschließend ESCRT-abhängig aus der Zelle entlassen. (Modifiziert nach [2]).

1.2 HBV-Infektion

1.2.1 Übertragung und Prävalenz

Das Hepatitis-B-Virus wird, vor allem in hochendemischen Gebieten, durch perinatale Transmission von der infizierten Mutter auf das neugeborene Kind übertragen oder horizontal von Kind zu Kind in den ersten fünf Lebensjahren. In beiden Fällen besteht für das Kind ein Risiko von 95% zur Entwicklung einer chronischen Hepatitis B, während das Risiko für Erwachsene bei etwa 5% liegt. Ein weiterer, häufiger Übertragungsweg im Erwachsenenalter stellt der Blut- und Flüssigkeitskontakt mit infizierten Personen dar. Dazu gehören Wunden durch Nadeln, Tätowierungen, Piercings und allgemein der Kontakt zu infiziertem Blut, Speichel, menstruale und vaginale Flüssigkeit sowie Samenflüssigkeit. Die WHO verzeichnet ebenso ein erhöhtes Risiko zur Übertragung bei Promiskuität, Sexualkontakt zwischen ungeimpften Männern oder Sexualkontakt gegen Entgelt. Die Tatsache, dass das Virus noch bis zu sieben Tage außerhalb des Körpers infektiös bleibt, erhöht zudem die Gefahr von Übertragungen [104].

Weltweit zeigen etwa 2 Milliarden Menschen serologische Marker für eine HBV-Infektion [105]. Nach Schätzungen der WHO lag die Zahl der Patienten mit chronischer Hepatitis-B-Virus Infektion im Jahre 2015 bei 257 Millionen. Im selben Jahr führte dies zu ca. 887.000 Todesfällen, ausgelöst durch Zirrhosen oder dem hepatozellulären Karzinom (*hepatocellular carcinoma*, HCC). Für das darauffolgende Jahr wurde angegeben, dass nur etwa 27 Millionen Menschen, also ca. 10% der Infizierten, von ihrer eigenen Infektion wussten. Von diesen wurden wiederum nur 4,5 Millionen Patienten gegen die Erkrankung behandelt [104]. Weltweit liegt die höchste Prävalenz im afrikanischen und asiatischen Raum (**Abbildung 7**). Während die Übertragung in Subsahara-Afrika und Ostasien hauptsächlich perinatal geschieht, sind in den Industriestaaten primär Drogenkonsum über Nadeln sowie sexueller Kontakt die Ursache für eine Transmission [106]. In Nord- und größtenteils Südamerika, Australien sowie in Deutschland liegt nur eine geringe Prävalenz von unter 2% vor [107].

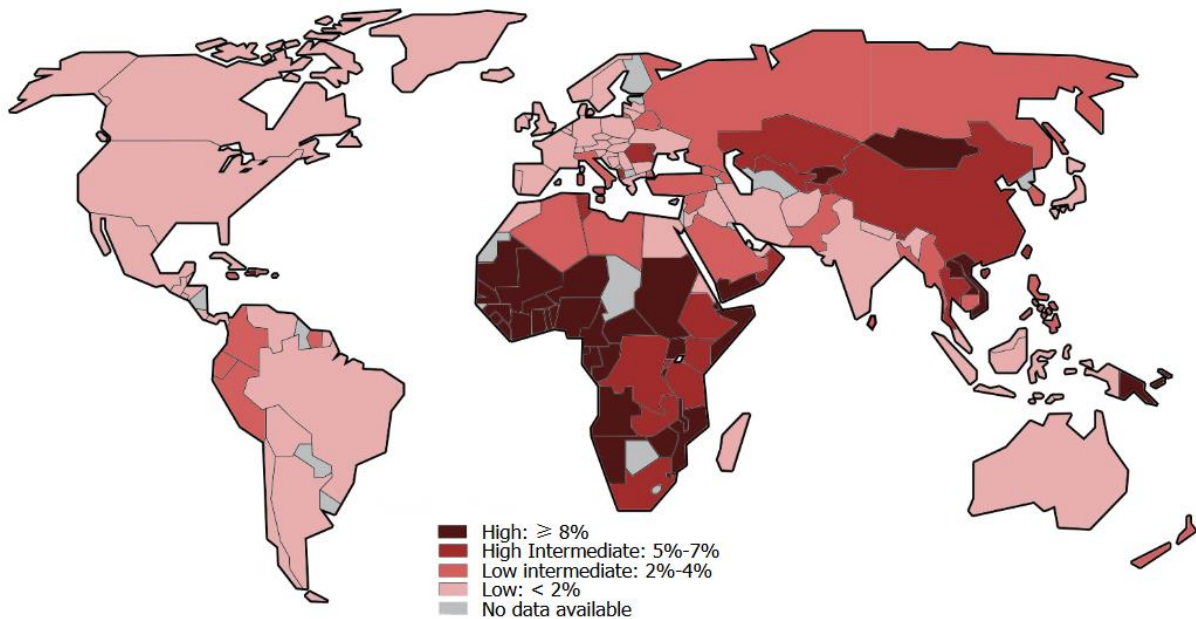


Abbildung 7: Globale Prävalenz an HBV-Infektionen. Die Karte zeigt die HBV-Prävalenz in den unterschiedlichen Ländern. Eine hohe Prävalenz, also über 8%, haben beispielsweise Subsahara-Afrika, die Mongolei oder Papua-Neuguinea. Etwas geringer, mit 5-7%, liegen China, Kasachstan oder der Kongo. Eine Prävalenz von 2-4% weisen Russland, Kolumbien, Peru und Italien auf. Als niedrigprävalent, und damit unter 2%, zählen Nordamerika, große Teile Südamerikas, sowie Australien und auch Deutschland. (Übernommen aus [107]).

1.2.2 Akute HBV-Infektion

Eine akute Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus kann sich in einer Entzündung der Leber, einer Hepatitis äußern. Zu den häufigsten Symptomen einer Infektion zählen Fieber, Muskel- und Gelenkschmerzen, Übelkeit, Appetitlosigkeit, dunkler Urin, heller Stuhlgang und der Ikterus [108]. In den meisten Fällen verläuft eine Infektion jedoch asymptomatisch [109]. Die ersten serologischen Marker die sich während einer akuten Hepatitis B zeigen, sind die DNA des Virus, gefolgt von HBsAg und HBeAg (**Abbildung 8**) [110]. HBsAg kann zwischen der ersten und zwölften Woche nach Infektion im Serum detektiert werden, dabei kann ein Verbleiben an HBsAg auf die Chronifizierung der Infektion hindeuten. Während einer akuten Infektion zeugt die Anwesenheit von HBeAg immer (außer bei gtG) auch von einer hohen Replikationsrate des Virus und Infektiosität des Patienten [111]. Innerhalb weniger Wochen nach Auftritt der ersten serologischen Marker ist ein erhöhtes Level der Leberenzyme Alanin- und Aspartat-Aminotransferase (ALT und AST) im Serum detektierbar. Parallel dazu entwickelt sich häufig das für eine Hepatitis typische Symptom der Gelbsucht. Während der Wert an HBeAg normalerweise mit dem Erreichen des maximalen Krankheits- und Symptomverlaufs unter die Nachweisgrenze sinkt, verbleiben HBsAg und virale DNA messbar im Serum bis die Krankheit überstanden und der Patient symptomfrei ist.

Zusammen mit der Abnahme der DNA und der Antigene, sowie mit der Zunahme an Serum-ALT, findet während dieser Periode auch eine erhöhte Infiltrierung von T-Zellen in der Leber statt [112–114]. Auch die Detektion von Antikörpern stellt einen wichtigen Marker dar. Kurz bevor der klinische Krankheitsverlauf beginnt, sind in der Regel bereits HBcAg-spezifische Antikörper nachweisbar, welche zunächst in Form von IgM vorliegen und schließlich durch anti-HBcAg IgG-Antikörper ersetzt werden. Mit der Verringerung des HBeAg-Levels im weiteren Verlauf steigt schließlich die Menge an HBeAg-spezifischen Antikörpern, weshalb die Präsenz an anti-HBeAg-Antikörpern in akuten Infektionen auch als Marker für eine bevorstehende Genesung gilt. Wesentlich später, nämlich in der späten Genesungs- bzw. Rekonvaleszenzphase, in der auch nachweisbares HBsAg geklärt ist, sind schließlich HBsAg-spezifische Antikörper im Serum detektierbar. Diese HBsAg-spezifischen Antikörper verbleiben im Serum und vermitteln die eigentliche Immunität gegen eine wiederholte HBV-Infektion. Als Marker für eine durchgemachte Infektion wird dennoch anti-HBcAg verwendet, da HBsAg-spezifische Antikörper von einer Impfung stammen können und zudem etwa 15% der Patienten keine dauerhaft detektierbaren HBsAg-Antikörper nach einer Infektion entwickeln. Für den Erfolg einer Immunisierung mit einem HBV-Vakzin wird hingegen der anti-HBsAg-Titer als Marker verwendet [114].

Das HBV selbst zeigt so gut wie keine zytopathischen Effekte auf die infizierten Zellen. Verantwortlich für die Pathogenese der Leber ist vor allem das Immunsystem selbst – genauer gesagt das adaptive Immunsystem [115,116]. Bei einer Infektion wird das Virus vom angeborenen Immunsystem so gut wie nicht erkannt, was dazu führt, dass eine erste Reaktion in Form von beispielsweise den Typ I Interferonen α und β ausbleibt. Somit kann das Virus einige Wochen lang unentdeckt replizieren, wobei zytopathische Effekte an der Leber ebenfalls ausbleiben, bis es schließlich vom adaptiven Immunsystem erkannt wird [115,117–119]. Als Antwort werden $CD4^+$ T-Zellen aktiviert, welche wiederum HBV-spezifische, zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen induzieren, die letztlich für die Beseitigung von mit dem Virus infizierten Zellen verantwortlich sind. Die Antikörperproduktion gegen HBsAg durch spezifische Plasmazellen verhindert zusätzlich die Ausbreitung und schützt vor Neuinfektionen [115,113]. Während die Sekretion von Interferon γ und Tumor Nekrose Faktor α durch die T-Zellen zwar bei einer nicht-zytopathischen Klärung des Virus hilft, führt das Töten HBV-infizierter Hepatozyten durch die zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen schließlich zu der eigentlichen akuten Hepatitis und damit zum Anstieg des Serum-ALT-Levels [112,120,80,115].

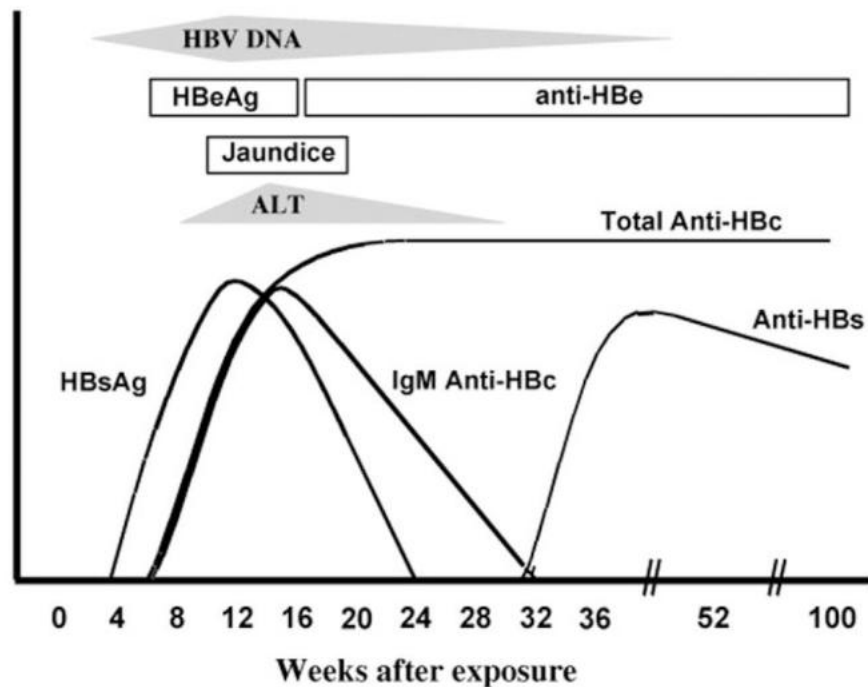


Abbildung 8: Verlauf einer akuten Hepatitis B mit serologischen Markern. Noch vor dem ersten Aufkommen von Symptomen sind etwa vier Wochen nach einer Infektion mit HBV HBsAg, HBeAg und virale DNA im Patientenserum detektierbar. Während HBeAg nur etwa bis zum Höhepunkt des Krankheitsverlaufs detektiert werden kann und sich mit dessen Verschwinden HBeAg-spezifische Antikörper bilden, verbleiben HBsAg und DNA bis zum Ende der Erkrankung und der Symptome im Blut. Ab der Mitte des Krankheitsverlaufs steigen die Serum-ALT-Werte und nehmen zusammen mit DNA und HBsAg im weiteren Verlauf wieder ab. Nach einer abgeheilten Infektion verbleiben im Blut hauptsächlich HBcAg- und HBsAg-spezifische Antikörper. Während erstere als Marker für eine vergangene Infektion dienen, wird anti-HBsAg vor allem als Maß für den Erfolg einer Vakzin-basierten Immunisierung verwendet [121].

1.2.3 Chronische HBV-Infektion

Die Entwicklung einer chronischen Hepatitis B ist einer der weltweiten Hauptgründe zur Entstehung von Leberfibrosen, Leberzirrhosen und hepatozellulärem Karzinom [122]. Die Gründe, weshalb es zur Entstehung einer chronischen HBV-Infektion kommt, liegen einerseits im Unvermögen des angeborenen Immunsystems das Virus zu entdecken und andererseits in den immunosuppressorischen Eigenschaften der viralen Proteine. Die Aufrechterhaltung der Chronizität wird wiederum maßgeblich durch das adaptive Immunsystem bedingt, welches nicht in der Lage ist, die Viruslast vollständig zu beseitigen. Im Falle einer effektiven Immunantwort werden infizierte Hepatozyten eliminiert und die Infektion damit geklärt. Bei einer chronischen Hepatitis B liegt hingegen eine unzureichende Immunantwort vor, welche nur einen Teil der infizierten Zellen zerstört. Die verbleibenden, noch infizierten Zellen infizieren wieder weitere, gesunde Zellen, welche im Zuge der Leberregeneration entstanden sind. Dies löst einen Kreislauf der Zerstörung und

Regeneration aus, der schließlich in einem Ungleichgewicht mündet und zu Fibrosen und Zirrhosen führt [123,124].

HBV gilt als stilles Virus – wie bereits zuvor erwähnt löst es bei einer Infektion nur eine schwache Typ-I Interferonantwort aus [118,125]. Dies bedeutet, dass es in der Lage ist, dem angeborenen Immunsystem weitestgehend auszuweichen. So kann der *pattern recognition receptor* (PRR) RIG-I zwar die Haarnadelstruktur ϵ der pgRNA erkennen und eine starke Typ-III Interferonantwort, jedoch nur eine geringe Typ-I Antwort auslösen [126]. Das Virus kann die Typ-I Immunantwort über verschiedene Wege stören. Einer davon ist die Bindung der HBV Polymerase an die DDX3 DEAD Box RNA-Helicase, welche über Störung des IFN-regulatorischen Faktor 3 (IRF3) zur Inhibition der IFN- β Induktion führt [127,128]. Das HBx bindet hingegen an das *mitochondrial antiviral signaling* (MAVS) Protein, ein RIG-I Adapterprotein, zur Inhibition der IRF3-Aktivierung [129,130]. Zwar können die *Toll-like* Rezeptoren (TLR), welche als PRRs spezifische *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) erkennen, die HBV-Replikation unterdrücken, jedoch stellt hierbei TLR2 eine Ausnahme dar [131]. Die Expression von TLR2 scheint die HBV-Persistenz noch zu unterstützen. Das Virus reguliert TLR2 in Kupferzellen hoch, was zu einer Produktion von IL-10 und Suppression von CD8⁺ T-Zellen führt [132]. Zusätzlich unterdrückt HBeAg den TLR-Signalweg, was in einer geringen Expression an TFN- α mündet [133]. Auch die durch Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) vermittelte Immunantwort kann von HBV umgangen werden, indem es die Expression der positiven und negativen Regulatoren dieser Zellen beeinflusst [134]. Weiterhin besitzt auch das HBsAg immunosuppressorische Eigenschaften, welche maßgeblich an der für chronische Infektionen typischen T-Zell-Erschöpfung beteiligt sind [135]. Auch die für eine adaptive Immunantwort entscheidenden Dendritischen Zellen (*dendritic cells*, DCs) sind in chronisch infizierten Patienten nur eingeschränkt funktional [136]. HBV scheint hierbei die Reifung der DCs in Abhängigkeit von TLR9 zu unterbinden. Die ungenügende Funktionalität der DCs hat wiederum Einfluss auf die Aktivität der CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen [137–139]. HBsAg führt bei myeloiden DCs (mDCs) zu einer Abnahme der T-Zell-stimulatorischen Kapazität und zu reduzierter IL-12 Produktion [140]. Die Bindung an Monozyten und Makrophagen durch HBsAg inhibiert durch Störung der Signalkaskade die TLR-abhängige Produktion von IL-12 und IL-18 [141,142]. Ein weiteres großes Problem stellt die Anwesenheit der cccDNA innerhalb der infizierten Zellen dar, welche als Minichromosom eine hohe Stabilität besitzt, sowie die integrierte virale DNA. Beide können vom Immunsystem nicht als Ziel ausgemacht werden [143].

Die bereits erwähnte T-Zell Erschöpfung ist eines der Hauptgründe für das Bestehenbleiben einer Chronizität. In einigen Patienten führt die dauerhafte Exposition und übermäßige Präsenz viraler Proteine und Peptide, in Kombination mit viralen Immun-Ausweichstrategien, zu einem Mangel an gereiften HBV-spezifischen T-Zellen [144–146]. Zusätzlich führt die

Exposition der T-Zellen mit viralen Antigenen über Jahre der Chronizität zur Expression inhibitorischer Rezeptoren. Die daraus resultierende, ungenügende Antwort der zytotoxischen T-Lymphozyten (*cytotoxic T lymphocytes*, CTLs) ist durch die erhöhte Expression des Proteins/Rezeptors *programmed death 1* (PD-1) in HBV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen bedingt. Zudem wird zeitgleich der Ligand PD-Ligand 1 (PD-L1) in Kupfferzellen vermehrt exprimiert. PD-1 ist der wichtigste Regulator der T-Zell Erschöpfung und führt bei Interaktion der beiden Zelltypen in chronisch infizierten Patienten zu einer negativen Modulation der CTL-Antwort bis hin zur Apoptose der HBV-spezifischen T-Zellen [147,148,145,149,150]. Gleichzeitig steigt allerdings die Zahl an immunosuppressiven regulatorischen T-Zellen an [151]. Diese Erkenntnisse gehen mit den Beobachtungen einher, dass die HBV-spezifische CTL-Antwort in chronischen HBV-Patienten gegenüber jenen mit ausgeheilter Infektion offensichtlich deutlich vermindert ist [115].

In die Reparaturmechanismen der Leber sind auch nicht-parenchymale Zellen wie hepatische Sternzellen und Myofibroblasten involviert, um die Integrität des Gewebes aufrecht zu erhalten. Diese Zellen scheiden unter anderem Komponenten der extrazellulären Matrix im natürlichen Ablauf der Wundheilung ab [152,153]. Bei einer chronischen HBV-Infektion, mit einer immer wiederkehrenden Schädigung der Leber, kommt es zu einer Deregulation dieses Mechanismus mit einer übermäßigen Ansammlung intrahepatischer extrazellulärer Komponenten, welche schließlich zu einer Leberfibrose führt [80]. Im weiteren Verlauf werden über mehrere Jahre gesunde Hepatozyten durch dysfunktionales fibrotisches Narbengewebe ersetzt, was letztlich zu einer Leberzirrhose und schließlich zum vollständigen Versagen der Leber führt [154].

Der natürliche Verlauf einer chronischen Hepatitis-B-Virus-Infektion wird für gewöhnlich in vier verschiedene Phasen gegliedert (**Abbildung 9**): Die immuntolerante Phase ist gekennzeichnet durch eine hohe Replikationsrate des Virus, die Anwesenheit von HBeAg und einen normalen bis niedrigen Serum-ALT-Wert. In der zweiten Phase, der Immun-*Clearance*-Phase, verbleiben die Patienten HBeAg-positiv, verzeichnen aber einen Anstieg des ALT-Levels zusammen mit einer Abnahme der Menge an viraler DNA (HBeAg^{pos} chronische Hepatitis B). In der darauffolgenden Niedrigreplikations- oder Restphase (*low replication phase / residual phase*) kommt es zur Serokonversion von HBeAg-spezifischen Antikörpern und einem Klären von HBeAg sowie zu einem Nachlassen der Leberschädigung bzw. Absenkung des Serum-ALT-Wertes. Diese Phase wird deshalb auch als inaktiver Trägerzustand (*inactive carrier state*) bezeichnet. Etwa 20-30% der Patienten in der inaktiven Phase erleiden jedoch einen replikativen Rückfall und kommen in die letzte, sogenannte Reaktivierungsphase (HBeAg^{neg} chronische Hepatitis B) [155,156]. Wiederholte Episoden dieser Reaktivierung können einen fortschreitenden Leberschaden verursachen. In vielen Fällen verläuft die Reaktivierung allerdings auch symptomlos [157,158]. Die einzelnen

Phasen müssen nicht zwangsläufig vollständig durchlaufen werden. Ebenso können Phasen im Krankheitsverlauf übersprungen werden [159].

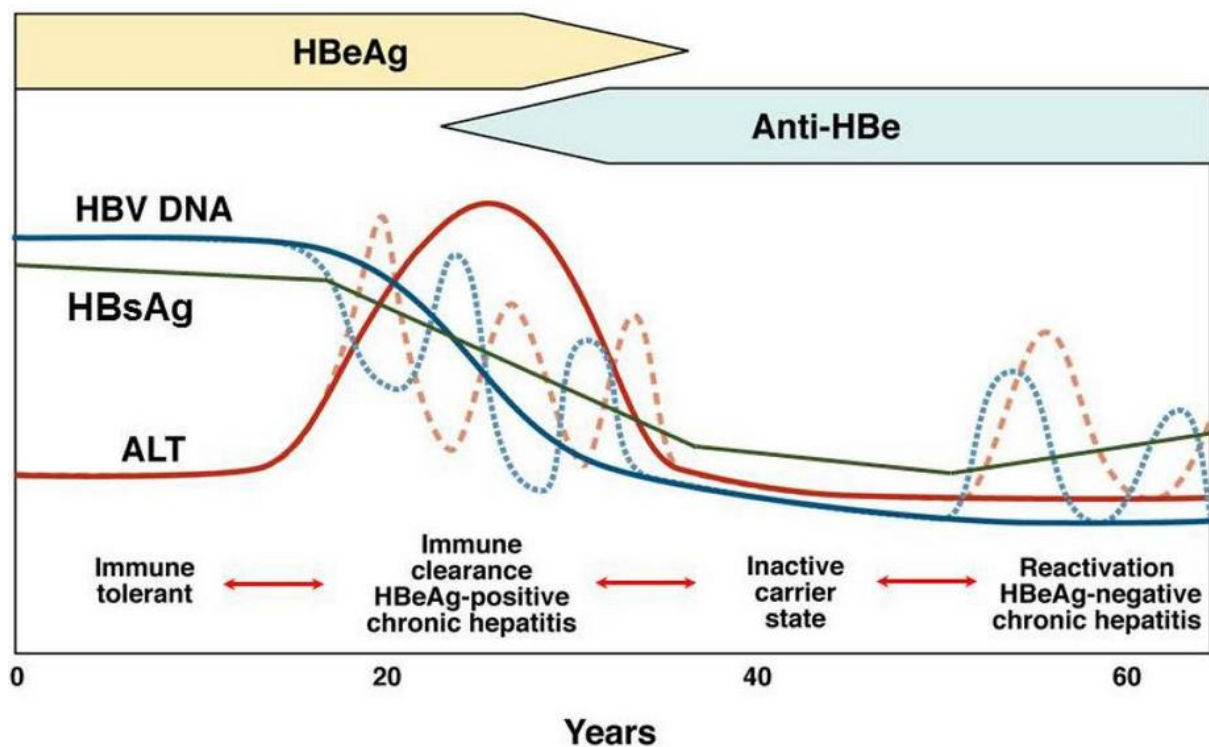


Abbildung 9: Verlauf einer chronischen HBV-Infektion. Die Einteilung der Phasen einer chronischen Hepatitis B definiert sich aus Anwesenheit von HBeAg, Serum HBV DNA und dem ALT-Wert. In der immuntoleranten Phase liegt ein hoher HBeAg- und normaler ALT-Wert, sowie große Mengen an viraler DNA vor. In der zweiten, der HBeAg^{pos} chronischen Hepatitis B Phase steigt zusätzlich das ALT-Level an. Im *inactive carrier state*, der inaktiven Trägerphase, sind Patienten HBeAg-negativ und DNA und ALT-Werte sehr niedrig. In der Reaktivierungsphase, auch HBeAg^{neg} chronische Hepatitis B genannt, verbleiben die Patienten HBeAg-negativ, verzeichnen jedoch einen Anstieg an DNA und ALT [159].

1.3 Impfstoffe und Therapien gegen Hepatitis B

Der erste Versuch zur Entwicklung eines Impfstoffs gegen Hepatitis B wurde vom Entdecker des HBV, bzw. des *Australia Antigen*, Baruch Blumberg zusammen mit Irving Millman Ende der 60er Jahre unternommen. Dabei wurde versucht, infektiöse Partikel aus den Blutproben von infizierten Patienten durch Dichtegradientenzentrifugation zu entfernen und verbleibende Partikel anschließend mit Formaldehyd und Hitzeinaktivierung zu attenuieren. Der Impfstoff basierte somit hauptsächlich auf dem HBsAg des Patientenblutes [160]. Der erste kommerzielle Impfstoff war *Heptavax-B™* der Firma Merck, welcher formalin-inaktiviertes und gereinigtes HBV-Patientenblut sowie Alum enthielt [161]. Seit 1986 existiert ein nichtinfektiöser, rekombinanter und in Hefen produzierter HBsAg-basierter Impfstoff (z.B.

Engerix B[™], SmithKline Beecham Biologicals, Rixensart, Belgien). Der Impfstoff wird intramuskulär (i.m.) in Monat 0, 1 und 6 injiziert und generiert etwa einen Monat nach der letzten Dosis eine prophylaktische Seroprotektivität von 85-100% in Neugeborenen, Kindern und Erwachsenen. Als Maß für die Protektivität des Impfstoffs wird hierbei der Nachweis von HBsAg-spezifischen Antikörpern im Serum der Geimpften herangezogen. Als protektiv gilt ein Titer von ≥ 100 IU/L – wobei Patienten mit einem Titer von 10-100 IU/L als sogenannte *low-responder* oder mit Werten ≤ 10 IU/L als *non-responder* gelten [162–164,10]. Seit dem Jahre 2017 ist der Impfstoff HEPLISAV-B[®] der Firma Dynavax Technologies Corporation in den USA zugelassen. Das in der rekombinanten Hefe *Hansenula polymorpha* produzierte HBsAg wird mit dem Adjuvans CpG (Desoxycytidin – Phosphorsäure – Desoxyguanosin, 5'-3') versetzt und bringt den Vorteil mit sich, Patienten ab einem Alter von 18 Jahren mit nur zwei Impfdosen innerhalb eines Monats (Dosen je Monat 0 und Monat 1), statt drei Dosen in 6 Monaten zu immunisieren [165,166]. Ein Vakzin der dritten Generation namens Sci-B-Vac[™], dessen EU-Zulassung für das Jahr 2020 angestrebt wird, wurde mittlerweile bereits für Isreal und 14 andere ostasiatische Länder zugelassen. Dieser auf S, PreS1 und PreS2 basierende Impfstoff, welcher in CHO-Zellen (*chinese hamster ovary*) produziert wird, zeigt eine verbesserte Immunantwort in älteren Patienten sowie Patienten mit Immunbeeinträchtigung und *low-respondern*, im Vergleich zu älteren Impfstoffen. Durch die Gabe dieses Impfstoffes werden hohe anti-HBsAg-Titer erreicht, obgleich mit geringen Dosen von 2,5-10 µg/Dosis geimpft wird [167]. Zudem könnte es einen vielversprechenden Kandidaten für eine therapeutische Impfung gegen chronisch infizierte HBV-Patienten darstellen [168].

Etwa 5% der Geimpften sprechen nicht oder unzureichend auf die Impfung an. Diese *non-responder* können in der Regel keine ausreichende, HBsAg-spezifische B- oder T-Zellantwort aufbauen [108,169]. Bei einer akuten Hepatitis B wird zumeist nur mit einer medikamentösen Minderung der Symptomatik therapiert, aber nicht mit dem Einsatz sogenannter *antivirals*. Grund dafür ist die sehr häufige, spontane Ausheilung und Klärung der Infektion [23]. Für Patienten, welche eine chronische HBV-Infektion entwickeln, gibt es bis heute hingegen keine Therapie, die eine vollständige Heilung der Erkrankung herbeiführt. Zwar spricht man auch von einer Heilung, wenn es zu einer Klärung des HBsAg und gleichzeitigen Serokonversion zu anti-HBsAg-Antikörpern kommt, wie es in bis zu 1% der chronisch infizierten Patienten der Fall ist. Jedoch kann trotz Serokonversion noch über Jahrzehnte hinweg eine persistente HBV-Infektion vorliegen, was keiner Heilung im Sinne einer vollständigen Klärung des Virus entspricht [151,170]. Therapiert wird in diesen Fällen mit der Gabe von rekombinant produziertem und teilweise PEGyliertem Interferon- α (IFN- α) oder genauer IFN- α -2a, IFN- α -1b und IFN- α -2b. Die Behandlung führt zur Unterdrückung der Virusreplikation, einer effektiveren HBeAg- und HBsAg-Antikörperkonversion und zu weniger

Fällen von HCC und Zirrhosen [171,172]. Die Behandlung mit IFN ist allerdings nur in etwa 10-15% der Fälle erfolgreich und führt zudem zu erheblichen Nebenwirkungen [173]. Daneben hat sich eine weitere Substanzklasse zur antiviralen Therapie und Unterdrückung der viralen Replikation etabliert: Die Nukleotid- und Nukleosidanaloga (NAs). Diese stellen mittlerweile die Standardtherapieform dar. NAs wie beispielsweise Lamivudin, Adefovir, Entecavir oder Tenofovir inhibieren die HBV Reverse Transkriptase, indem sie mit den natürlichen Nukleotiden um den Einbau in die DNA konkurrieren und somit die DNA-Synthese stören [174,175]. Der Nachteil dieser Therapie besteht in dem hohen Aufkommen an Resistenzen. So entwickeln 80% der Behandelten nach 5 Jahren eine Resistenz gegen Lamivudin [176]. Das NA Telbivudin kann für schwangere, chronisch infizierte Frauen angewandt werden, um eine Übertragung der Infektion auf das Kind zu vermeiden – bei einer therapeutischen Anwendung über drei Jahre entwickeln sich jedoch auch hier in 34% der Fälle Resistenzen [177–180].

Auch wenn sowohl (PEG)-IFN als auch NAs die HBV-Replikation unterdrücken, so zielen sie nicht direkt auf die Eliminierung der cccDNA oder das Töten infizierter Zellen ab. Aus diesem Grund fokussiert sich die Entwicklung von Therapeutika auf die Entfernung von cccDNA und die Mobilisierung bzw. Reaktivierung von spezifischen T-Zellen. Die virale Persistenz in chronischen Infektionen beruht vor allem auf einer Immuntoleranz gegen HBV. Diese verlangsamt zwar eine Schädigung der Leber, verhindert allerdings auch die Klärung der Infektion durch eine Antigen-spezifische T-Zell-Erschöpfung oder –Beseitigung und geringere Expansion und Proliferation [181,135]. Einer der ersten Versuche dieses Problem zu lösen bestand in der Applikation des bereits bestehenden Impfstoffs. Obwohl es zu einem therapeutischen Effekt in Form einer Abnahme der Virusreplikation in chronisch mit DHBV infizierten Tieren kam, blieb der Effekt in chronisch infizierten Menschen aus [182–184]. Es gab seitdem eine Vielzahl präklinischer Ansätze, um die T-Zell-Antwort in chronisch infizierten Patienten zu verbessern – darunter DNA-, Peptid- und Vektor-Vakzine sowie Impfstoffe mit multiplen Epitopen. Doch die Immunogenität war bei allen Ansätzen unzureichend, weshalb es nie zur Umsetzung in die klinischen Phasen kam [185,186]. Dennoch gab es Ansätze, die in klinischen Phasen untersucht wurden, wie ein HBV-Antigen/HBV-Antikörper-Komplex versetzt mit Alum, der in einer Phase III-Studie eingestellt wurde [187], ein DNA-Vakzin, das für die Oberflächenproteine kodiert, aber keine Serokonversion herbeiführen konnte [188,189] oder ein DNA-*Prime* (kodierend für die S-Domäne) mit nachfolgendem *Boost* basierend auf einer Pockenvirusplattform (kodierend für PreS1, PreS2 und S), der eine erfolgreiche Immunantwort in Schimpansen auslösen konnte, schließlich aber in einer klinischen Phase II-Studie versagte [190,191]. Bisherige Ansätze scheiterten an der Induktion einer T- und B-Zellantwort, da sie entweder keine genügende Immunogenität besaßen oder nur jeweils eine T- (wie das DNA-Vakzin) oder eine B-

Zellstimulation (wie HBsAg mit Alum) herbeiführten, aber nicht beides gleichzeitig. Aktuell befindet sich eine Reihe von therapeutischen Vakzinen in klinischen Studien, die noch nicht beendet sind. Zum Beispiel besteht eine Phase I/II-Studie in der Entnahme von patienteneigenen dendritischen Zellen und deren Stimulation mit HBsAg mit nachfolgender Co-Kultivierung von T-Zellen. Die generierten HBsAg-spezifischen T-Zellen werden anschließend zurück in den Patienten transfundiert, welcher gleichzeitig mit PEGyliertem IFN oder NAs behandelt wird (NCT01935635). Eine Phase IIb-III-Studie verwendet ein S/core-Protein-Vakzin in paralleler Behandlung mit NAs für HBeAg-negative, chronisch infizierte Patienten (NCT02249988). Und ein HBV-DNA-Vakzin befindet sich derzeit in Phase I (NCT00277576), welches über *particle-mediated epidermal delivery* (PMED) verabreicht wird, bei dem mittels eines Stoßes Heliumgas einige DNA-besetzte, mikroskopische Goldpartikel über die Haut aufgenommen werden [192].

Ein therapeutischer Impfstoff gegen chronische HBV-Infektionen muss sowohl HBV-spezifische Antikörper als auch HBV-spezifische, effektive, zytotoxische T-Zellen generieren. Dabei können zusätzliche Behandlungen parallel zur Applikation des Vakzins den Erfolg unterstützen. Eine Kombinationsstrategie wäre zum Beispiel die Gabe verschiedener Konzentrationen von Nukleo(s)tid-Analoga zur Kontrolle der Virämie und Verhinderung einer möglichen fulminanten Hepatitis, indem zunächst stark HBV-produzierende Zellen eliminiert werden. Dazu die Verabreichung des eigentlichen therapeutischen Impfstoffs, welcher über die B-Zellstimulation HBV-spezifische Antikörper generiert, um die Antigenbelastung zu reduzieren und eine Neuinfektion von gesunden Hepatozyten zu verhindern. Gleichzeitig aktiviert er eine robuste und spezifische CD8⁺ T-Zellantwort, um alle infizierten Hepatozyten vollständig zu eliminieren. Zusätzlich zur Applikation des Impfstoffes können sogenannte Checkpoint-Inhibitoren wie anti-PD1- oder anti-CTLA4-Antikörper eingenommen werden, welche der T-Zellerschöpfung entgegenwirken und ein eventuelles *de-novo-Priming* HBV-spezifischer T-Zellen fördern [186,193,194].

1.4 Virus-ähnliche Partikel

Unter Virus-ähnlichen Partikeln (*virus-like particles*, VLPs) versteht man Proteinstrukturen aus mehreren Untereinheiten, die von selbst zu Partikeln assemblieren und strukturell identisch oder sehr ähnlich zu den Strukturen eines natürlichen Virus sind [195]. Impfstoffe, welche auf VLPs basieren, bringen die Eigenschaften klassischer, auf attenuierten Viren basierender Impfstoffe mit sich wie eine hohe Immunogenität, die geordnete Oberflächenstruktur und die korpuskuläre Geometrie, in einer meist ikosaedrischen oder helikalen Form [167,196]. Zusätzlich fehlt ihnen aber im Gegensatz zu attenuierten Viren ein virales Genom, was sie dadurch zu sichereren Impfstoff-Plattformen macht [167]. Sie können

in über 170 verschiedenen Expressionssystemen produziert werden wie Hefen, Insektenzellen, Bakterien und Säugerzellen, wobei fast 30% der Partikel in bakteriellen Systemen wie *Escherichia coli* unter Codon-Optimierung und effizienten Promotoren produziert werden [167,197–199]. Man unterscheidet zwei Klassen von VLPs: Die umhüllten und nicht-umhüllten VLPs. Bei den umhüllten handelt es sich um Strukturen gebildet aus der Wirtsmembran mit eingelagerten Virusproteinen, bei den nicht-umhüllten um Capside, welche aus den viralen Capsid-Untereinheiten gebildet werden. Weiter klassifiziert werden können sie in native und chimäre VLPs. Während die nativen VLPs von einem einzelnen Virus abgeleitet sind, können die chimären VLPs als Träger für eine Vielzahl unterschiedlicher viraler und bakterieller Proteine und Peptide anderer Pathogene oder weitere Virus-eigene Proteine fungieren. Einzelne Peptide weisen häufig eine zu geringe, eigenständige Immunogenität auf und wirken daher erst in Kombination mit Trägerpartikeln ausreichend immunstimulierend. Dabei fördert das eingesetzte VLP aufgrund seiner Geometrie und der hohen Dichte an präsentiertem Antigen die Bildung einer Immunantwort. Für die Präsentation von Eigen- oder Fremdontigenen auf den VLPs wird häufig die Sequenz dieser Antigene direkt in die Sequenz der VLPs eingefügt. Da jedoch größere Proteine zu einer unvollständigen oder ausbleibenden Assemblierung der VLPs führen können, wird alternativ meist eine Bindung über chemische Konjugation zwischen Antigen und der Oberfläche der VLPs durchgeführt. Bisher wurden etwa 100 verschiedene VLPs aus 35 unterschiedlichen Virusfamilien erzeugt [200,201]. Zu den Bedeutsamsten unter ihnen gehören neben den HBsAg-basierten VLPs vor allem jene basierend auf dem humanen Papillomvirus (HPV). HPV ist ein unbehülltes dsDNA-Virus, das Plattenepithelzellen der Haut und Schleimhäute infiziert und deren Hochrisiko-Subtypen wie beispielsweise HPV-16, -18 und -31 in 99% aller anogenitalen bösartigen Tumore detektierbar ist. HPV wird zudem als Hauptverursacher von Gebärmutterhalskrebs gesehen [202]. Es besteht die Möglichkeit, sich gegen HPV-Infektionen zu impfen – zum Beispiel mit dem quadrivalenten HPV-VLP-Impfstoff Gardasil®, welcher aus den L1-Capsiduntereinheiten der Typen 6, 11, 16 und 18 besteht oder Cervarix®, welcher eine Mischung der Capside der Typen 16 und 18 ist [203,204]. Die zweite Generation, Gardasil9®, ist bereits ein nonavalenter VLP-Impfstoff, welcher ebenfalls aus den Capsidproteinen der verschiedenen Subtypen aufgebaut ist [205].

Neben der Verwendung als Vakzin allein gegen HPV gab es ebenso Ansätze, die HPV-Capside als chimäre VLPs einzusetzen. Beispielsweise in Kombination mit SIV gag p27, HIV-1 tat und HIV-1 rev (SIV, *simian immunodeficiency virus*, Affenimmundefizienzvirus, HIV, humanes Immundefizienzvirus) [206]. Auch die Nutzung von Pflanzenviren wie dem CPMV (*cowpea mosaic virus*, Kuhbohnenmosaikvirus) wurde bereits getestet. So konnte ein 22 AS langes Peptid des gp41 Glykoproteins von HIV-I IIIB in die Oberflächenproteine S und L des CPMV eingebracht werden, welches in Mausversuchen bereits zur Expression

neutralisierender Antikörper führte [207]. Auch das Fusionieren des Protein F von *Pseudomonas aeruginosa* (PAE) mit dem L-Protein von CPMV führte zur Expression PAE-spezifischer IgG-Antikörper und zur Opsonierung der Bakterien in Mausversuchen [208]. Weitere erwähnenswerte chimäre VLPs sind ein Hybrid-VLP bestehend aus heterologen viralen Proteinen des Marburg- und Ebolavirus [209], ein Epitop des VP1 des Maul- und Klauenseuche-Virus auf dem Tabakmosaikvirus als Träger [210], das HCV-abgeleitete R10 Mimotop auf der Oberfläche des Gurkenmosaikvirus [211] oder selbst-assemblierende Hüllproteine des Papayamosaikvirus, welche das CTL-Epitop p33 des lymphozytischen Choriomeningitisvirus (LCMV) auf der Oberfläche tragen [212].

1.5 HBV-basierte VLPs

Wie bereits erwähnt existieren kommerzielle Impfstoffe gegen das HBV, welche auf HBsAg-VLPs basieren. Es gab allerdings auch Ansätze, diese HBsAg-basierten Partikel mit Fremdan antigenen als chimäre VLPs einzusetzen. So wurden Sequenzen verschiedener Länge der hypervariablen Region 1 (HVR1) des E2 Proteins des Hepatitis-C-Virus (HCV), welche verschiedene immundominante Epitope enthält, in die hydrophile und äußerst immunogene Determinante „a“ des SHBs (AS 127-128) eingefügt. Zuletzt auch deshalb, da dies zu einer Oberflächenexposition des HCV-Antigens führt. In Mausversuchen zeigte sich nach der Immunisierung mit diesen HVR1-HBsAg-VLPs ein erhöhter Titer HVR1-spezifischer Antikörper [213]. Interessanterweise wurde zusätzlich beobachtet, dass ein bereits vorhandener anti-HBs-Titer in Mäusen die Induktion von HVR1-spezifischen Antikörpern nach einer Immunisierung mit HVR1-HBsAg-VLPs nicht zu beeinflussen scheint [214]. In anderen Studien wurde ein Fusionsprotein aus HBsAg und einem Polyepitop aus HIV-1 Epitopen, gerichtet gegen HLA-A*0201 Klasse I Allele, in den Pflanzen *Nicotiana tabacum* und *Arabidopsis thaliana* als vollassemblierte VLPs exprimiert. Die Immunisierung von HLA-A*0201- und HLA-A*0201/HLA-DR1-transgenen Mäusen führte einerseits zu einer humoralen Antwort gegen den HBsAg-Carrier und zum anderen zu erhöhter Aktivität von HIV-1-spezifischen CD8⁺ T-Zellen [215,216]. In der methylotrophen Hefe *Pichia pastoris* wurde ein Fusionsprotein aus HBsAg und einem verkürzten Oberflächenprotein Den2E (*dengue virus typ 2 envelope protein*) des Denguevirus hergestellt. Das HBsAg-Den2E-VLP assembliert in der Hefe von selbst und könnte als bivalentes Vakzin wirken [217,218].

Neben HBsAg-VLPs besteht die Möglichkeit, HBV-Capside bzw. deren Untereinheiten, HBV-Core, als VLPs zu nutzen. Diese Capside bringen den Vorteil mit sich, dass potentielle (Fremd-)Antigene an verschiedenen Stellen eingebracht werden können. So gibt es Untersuchungen, bei denen PreS1 am N-Terminus, C-Terminus oder in die *Spike-Tip*-Region der Capside als Fusionsprotein eingebracht wurde. Die Position des Antigens

innerhalb des Core bestimmt dabei maßgeblich die Immunogenität des VLP. Eine Insertion der PreS1-Sequenz in den N-Terminus von Core führte nur mit der zusätzlichen Beteiligung eines Precore-Linkers zu hoher Immunogenität und Oberflächenpräsentation nach der Assemblierung. Ohne jenen Linker gab es nur ein schwaches Antikörpersignal und keine Präsentation. Beim Einfügen in den C-Terminus zeigte sich zwar eine Präsentation des Antigens an der Oberfläche, jedoch nur eine geringe Immunogenität. Wurde PreS1 jedoch in die *Spike-Tip*-Region eingefügt, wurde die effizienteste Antikörperantwort beobachtet. Zusätzlich verringerte sich die Immunogenität des Core-Anteils selbst, was zu einer sehr schwachen humoralen sowie zellulären Core-spezifischen Immunantwort führte. Letzteres bringt den zusätzlichen Vorteil mit sich, dass eine möglicherweise unerwünschte Immunantwort gegen den Trägeranteil des VLP ausbleibt oder zumindest stark verringert ist [219]. So wurden bereits Peptide der M2-Domäne des Influenzavirus im N-Terminus [220], des HI-Virus als oberflächenpräsentierte Antigene im N-Terminus [221] sowie multiple Epitope des Malaria-auslösenden *Plasmodium falciparum* sowohl im C-Terminus als auch in der *Spike-Tip*-Region eingebracht [222]. Ein interessanter Ansatz wurde in den 90er Jahren verfolgt, bei dem die PreS2-Region in den C-Terminus von Core fusioniert wurde und in *Salmonella typhimurium* und *Salmonella dublin* exprimiert wurde [223]. Die lebend-attenuierten Bakterien wurden daraufhin Balb/c-Mäusen I.P. injiziert, was zu einem hohen anti-HBcAg-Titer und detektierbaren anti-PreS2-Antikörpern führte. Auch die orale Applikation der rekombinanten Bakterien führte zu hohen anti-HBcAg-Titern [224]. Die *Spike-Tip*-Region als Insertionsstelle ist zusätzlich attraktiv, da sie nicht nur das Einfügen kurzer Peptide, sondern auch ganzer Proteine erlaubt. Es konnte bereits die vollständige Ektodomäne des OspA Proteins (*outer surface protein A*) des Lyme-Borrelioseerregers *Borrelia burgdorferi* [225] oder das komplette grün-fluoreszierende Protein (GFP) [226] in diese Region eingefügt werden – dabei wurde eine vollständige Assemblierung dieser VLPs beobachtet. Die Möglichkeit der Insertion solch großer Proteine in den *spike tip* hängt jedoch entscheidend von der Struktur und Konformation der Proteine ab. So kann GFP nur deshalb eingefügt werden, da sein N- und C-Terminus so nah nebeneinander liegen, dass sie in die Akzeptorseite des *spikes* passen und es deshalb zu keiner Beeinflussung der Assemblierung kommt [227]. Um ganze Proteine insertieren zu können, deren Termini weiter auseinander liegen, und dennoch assemblierende Capside zu erzeugen, entwickelte die Forschungsgruppe um Michael Nassal 2011 das *SplitCore* System [228]. Durch das künstliche Einfügen von Stop- und Start-Codons konnte das Core-Protein im *spike tip* zwischen Aminosäure 79 und 80 geteilt werden. Damit entstehen ein CoreN (AS1-79) und ein CoreC (AS 80-149 bzw. 183) Anteil, welche über einen bizistronischen Vektor in *E. coli* co-exprimiert werden können. Die beiden Komponenten assemblieren zu kompletten Capsiden, auch wenn an den nun zusätzlich vorhandenen Termini der beiden Komponenten

Proteine angefügt werden. Während die Insertion des OspA Proteins von *Borrelia burgdorferi* zuvor nur über Linker möglich war und auch nur teilweise zu assemblierenden Capsiden führte, konnte das Protein dank des *SplitCore* Systems nun direkt an den Terminus der N- bzw. C-Komponente von Core eingefügt werden und vollständige Capside erzeugt werden [228].

Trotz zahlreicher Insertionsstellen im Core-Protein können Peptide und vor allem Proteine die Assemblierung der VLPs stören. Um dieses Problem zu umgehen wurden Ansätze mithilfe von Adapterproteinen und chemischer Kopplung untersucht, um zwei getrennte Komponenten (Antigen und Trägercapsid) auf diese Weise zusammenzufügen. Beispielsweise konnten Peptide und Proteine mit freiem Cystein-Rest mit Capsiden chemisch gekoppelt werden, wenn diese ein Lysin in der immundominanten Region der *Spikes* aufweisen [229]. Ein weiterer Ansatz besteht darin, Peptide oder Proteine mit dem *Spike*-affinen Peptid GSLLGRMKGA zu fusionieren. Beim Hinzugeben bereits assemblierter Capside kommt es infolge dessen zu einer nicht-kovalenten Bindung zwischen Peptiden/Proteinen und den *Spikes* der Capside [230]. Durch die Fusion von tetramerem Streptavidin an Ovalbumin und dem Einfügen eines Strep-tag in die *Spike-Tip*-Region von HBV-Capsiden konnten *Akhras et al.* beobachten, dass es zu einer stabilen Bindung zwischen Antigen und Capsid durch Streptavidin-Strep-tag-Interaktion kommt [61].

1.6 Translocation motif (TLM)

In den 90er Jahren wurde beobachtet, dass Zellen, welche nicht-permissiv für eine Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus sind, teilweise dennoch infiziert werden können, wenn die Hepatitis-B-Viruspartikel bzw. deren Oberflächenproteine zuvor proteolytisch behandelt werden. Dies führte zur Postulierung eines fusogenen Peptids innerhalb des PreS2, welches nach Proteolyse-abhängiger Exposition notwendig für eine natürliche Infektion sei [231,232]. In späteren Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe konnte zunächst festgestellt werden, dass es sich bei PreS2 um ein zellpermeables Protein handelt, welches Energie- und Rezeptor-unabhängig durch Zellmembranen diffundieren kann. Auch bei einer Inkubationstemperatur von 4°C mit HepG2 und HEK-293 Zellen wurde eine Zellpermeabilität festgestellt. Eine Aufnahme über Rezeptor-abhängige Endozytose und Energie-abhängigen Transport ist bei dieser Temperatur ausgeschlossen. Daraus wurde gefolgert, dass es sich um einen passiven Transport handeln müsse. Als Ursache für diese Membrangängigkeit des PreS2 wurde ein Zellpermeabilität-vermittelndes Peptid innerhalb des PreS2 in Form einer amphipathischen α -Helix zwischen AS 41 und 52 identifiziert und als *Translocation motif* (TLM) bezeichnet. Die Aminosäuresequenz dieses TLM ist in allen HBV Genotypen hoch konserviert – zudem weisen viele Hepadnaviren ein ähnliches amphipathisches Profil

innerhalb des PreS auf, was für eine generelle Notwendigkeit des TLM während des Lebenszyklus dieser Viren spricht [48]. Durch Verwendung von TLM-defizientem DHBV konnte zudem beobachtet werden, dass die Viruspartikel ohne TLM während einer Infektion nicht in der Lage sind das endosomale Kompartiment zu verlassen [49]. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde ein neuer Mechanismus beim Eintritt des Virus in die Zelle formuliert, bei dem das Viruspartikel nach endosomaler Aufnahme nachfolgend durch permeable Diffusion aus dem Endosom ins Zytoplasma gelangt [49]. Aus den Eigenschaften des TLM ergaben sich eine Reihe wichtiger Anwendungsmöglichkeiten. Dabei ist die Vermittlung der Permeabilität des TLM nicht allein auf PreS2 beschränkt, sondern kann auch mit größeren Proteinen wie EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) fusioniert werden und dessen Permeabilität vermitteln [48]. Auch das normalerweise nur in geringen Mengen exprimierte HBx konnte als Fusionsprotein mit TLM in definierten Mengen in Zellen eingebracht werden, um dessen Lokalisation und konzentrationsabhängige Funktion analysieren zu können [84]. Durch ein Tre-Rekombinase-TLM Fusionsprotein konnte Tre-Rekombinase in Zielzellen eingebracht werden und hohe Rekombinationsaktivität auf die *long terminal repeat* (LTR)-Sequenzen von HIV-1 zeigen [233]. Durch Fusion des TLM an den N-Terminus von C-terminal verkürztem Core-Protein (AS1-153) oder vollständigem Core-Protein (AS 1-183) konnten zellpermeable Capside und Nukleocapside erzeugt werden. Während die Capside in einem bakteriellen Expressionssystem erzeugt wurden, wurden die Nukleocapside in SF9-Zellen (Insektenzellen) durch Tripelinfektion mit rekombinanten Bakuloviren produziert, welche für Core, Polymerase und ein *Packaging*-Plasmid kodierten. Dadurch konnte nicht nur demonstriert werden, dass TLM auch die Permeabilität kompletter, assemblierter Capside vermitteln kann, sondern auch das Einbringen von DNA kodierend für SHBs und EGFP für einen Gentransfer ins Zytoplasma bzw. zum Nukleus von Zellen ermöglicht. Im Vergleich zeigte sich, dass Wildtyp-Capside bzw. -Nukleocapside ohne fusioniertes TLM nicht in der Lage waren ins Zytoplasma der Zellen zu diffundieren [86]. Desweiteren wurden durch Fusion eines Strep-tag in die *spike*-Region dieser zellpermeablen Capside universelle Antigen-Trägerpartikel erzeugt. Werden Antigene mit Streptavidin fusioniert, so können diese auf die Oberfläche der zellpermeablen Capside geladen werden. Auf diese Weise konnte auch Ovalbumin, als Modellantigen, über eine Strep-tag-Streptavidin-Bindung auf der Oberfläche der permeablen Core-Partikel ins Cytoplasma von Zellen transloziert werden [61]. Dabei ist zu erwähnen, dass bisher noch in keinem Fall eine Limitierung bezüglich der Größe TLM-permeabilisierter Proteine oder Proteinkomplexe festgestellt werden konnte [85].

1.7 Alternative Immunisierungsrouten

Die mit Abstand häufigste Form der Immunisierung stellt die Verabreichung des Impfstoffs über Nadeln, wie bei der intramuskulären (i.m.) und subkutanen (s.c.) Injektion, dar [234]. Nadel-basierte Immunisierungen weisen allerdings eine Reihe von Nachteilen auf. Zum einen kann eine allgemeine Angst vor Injektionen Menschen daran hindern, sich impfen zu lassen [235,236]. Zum anderen besteht sowohl in Industrie- als auch in Entwicklungsländern die Gefahr von Verletzungen durch benutzte Nadeln. Beispielsweise kommt es in Krankenhäusern der USA zu etwa 300.000 Nadelverletzungen jährlich [237]. Neben unfreiwilligen Nadelstichen werden in Entwicklungsländern Nadeln häufig aus Kostengründen wiederverwendet [238]. Es wird geschätzt, dass die Wiederverwendung jährlich zu etwa 80.000 - 160.000 HIV-, 2,3 – 4,7 Millionen HCV- und 8 - 16 Millionen HBV-Neuinfektionen führt [239].

Die Suche nach alternativen Routen hat zudem auch immunologische Gründe: Während eine systemische Vakzinierung, wie über i.m. oder s.c. Injektion, auch fast ausschließlich eine systemische, aber keine mukosale Immunantwort erzeugt [240], kann die Antigenaufnahme über mukosales Gewebe sowohl mukosale als auch systemische Immunantworten induzieren [241].

Die geläufigste, nichtinvasive Applikationsform ist die (per)orale Verabreichung. Ein Beispiel hierfür stellt die Schluckimpfung gegen Polio dar (orales Poliovakzin, OPV), welche seit 1998 jedoch nicht mehr durch die Ständige Impfkommission (STIKO) empfohlen wird und durch das IPV (inaktiviertes Poliovakzin) ersetzt wurde [242]. Weiterhin wurde ein Ansatz entwickelt bei dem MLV-VLPs (murines Leukämievirus) mit *variant-specific surface proteins* (VSPs) der Protozoen *Giardia lamblia* gekoppelt werden. Diese VSPs zeigen hohe Resistenzen gegen proteolytische Degradation und einen niedrigen pH-Wert, wie er im Magen vorkommt. Co-dekoriert mit Hämagglutinin oder Neuramidase des Influenzavirus kann das Vakzin peroral aufgenommen werden ohne im Magendarmtrakt degradiert zu werden [243]. In einer anderen Studie wurden HBcAg-Partikel, hergestellt in der Pflanze *Nicotiana benthamiana*, i.m. appliziert und die Immunisierung mit einem *Boost* durch orale Gabe von HBcAg aus transgenem Salat ergänzt. Aufgrund der schützenden Bioenkapsilation in den Produzentenzellen sind die Partikel vor dem sauren Milieu des Verdauungstrakts geschützt und können eine mukosal-intragastrale sowie systemische Immunantwort in Mäusen auslösen [244]. Perorale Immunisierung basiert immer auf der Stimulation des *gut-associated lymphoid tissue* (Darm-assoziiertes Immunsystem, GALT), der Peyer's Plaques und den intestinalen APCs (*antigen presenting cells*, Antigen-präsentierende Zellen) im Darmtrakt [245]. Ähnlich der oralen Applikation stimuliert auch die Gabe über die intranasale Route mukosales Gewebe. Da viele Viren und Pathogene über dieses Gewebe eintreten, ist

es sinnvoll, dieses auch für die Immunantwort zu nutzen. Ähnlich der Stimulation des GALT nach peroraler Applikation wird bei intranasaler Gabe das *nasal-associated lymphoid tissue* (Nasal-assoziiertes lymphatisches Gewebe, NALT) stimuliert. Vor allem im Bereich der Influenza-Vakzinologie ist der Ansatz von Interesse. Lebend-attenuierte Influenzastämme können die Antigene in nativer Konformation im nasalen Gewebe präsentieren und somit eine natürliche Infektion nachahmen ohne Grippe-symptome hervorzurufen [246]. Ein Beispiel dafür stellt der nasale, tetravalente Influenza-impfstoff FluMist von Astra-Zeneca dar [247]. Auch für HBcAg-VLPs existieren intranasale Ansätze. Diese wurden zusammen mit HBsAg appliziert, um als Stimulans die Immunantwort gegen HBsAg zu verbessern, was in höherer Immunogenität und früherer Antikörperantwort in Mäusen mündete [248]. Eine Alternative zu mukosalen oder klassischen Routen stellt die intradermale Applikation dar. Diese wird bisher nur bei *Bacillus Calmette-Guérin*- (gegen Tuberkulose) und Tollwut-Impfstoffen verwendet. Dabei wird der Impfstoff in die Dermis und Epidermis gespritzt – die äußerst potenten ansässigen APCs, die Langerhans Zellen, vermitteln daraufhin auch bei sehr geringen Mengen eine effiziente Immunantwort [249]. Untersuchungen zur intradermalen Gabe von HBV-Impfstoffen ergaben, dass diese die Zahl der *Low*- und *Non-responder* im Vergleich zu intramuskulärer Injektion senken kann [250–252]. Ähnlich dazu gibt es Ansätze für transdermale Vakzinierung über elastische Liposome, Iontophorese und Mikronadeln [253]. Weiterhin gibt es Ansätze für konjunktivale (Aufnahme über die Bindehaut des Auges) [254] und aerosolische Immunisierungen [255].

1.8 Ziel des Projektes

Bis zum heutigen Tag existiert keine spezifische Therapie, die Patienten mit chronischer HBV-Infektion heilen kann. Der Ansatz der therapeutischen Vakzinierung stellt hierbei eines der vielversprechendsten Strategien dar. Das Ziel besteht einerseits darin, eine effiziente B-Zellantwort zur Induktion neutralisierender Antikörper zu stimulieren und andererseits spezifische T-Zellen zu generieren, welche infizierte Zellen vollständig eliminieren können. In dieser Arbeit sollen deshalb zellpermeable, TLM-fusionierte HBVcore-VLPs (TLMcapsid) als Trägercapside verwendet werden. Dabei werden TLM-HBVcore Monomere in *E. coli* produziert und diese anschließend *in vitro* zu Capsiden assembliert. Der Erfolg der Assemblierung dieser Capside soll hierbei charakterisiert werden. Diese besitzen zusätzlich einen Strep-tagIII in den *Spike-tips*, um Antigene, welche mit monomerem Streptavidin fusioniert wurden, auf der Oberfläche präsentieren zu können. Als Antigene sollen die HBV-Oberflächenproteine PreS1 und PreS2 fusioniert mit monomerem Streptavidin (mSA_preS1/2) verwendet werden, da PreS1 die Rezeptorbindedomäne enthält,

PreS1PreS2 MHC-I-restringierte (*major histo-compatibility complex*, Haupthistokompatibilitätskomplex) Peptide besitzt und das Fehlen der S-Domäne mit ihren Transmembrandomänen die Löslichkeit erhöht. Durch Strep-tag-Streptavidin Interaktion soll PreS1/2 auf die Oberfläche der TLMcapside gekoppelt und überprüft werden, ob es einerseits zu einer effizienten Kopplung beider Komponenten kommt und andererseits dieses Vakzin dank der TLM-vermittelten Permeabilität ins Zytoplasma von Zellen eingebracht werden kann. Im Zuge dessen soll getestet werden, ob durch die Aufnahme dieses Vakzins durch APCs *in vivo*, nach intraperitonealer (I.P.) Injektion, spezifische CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen in der Folge aktiviert werden und es zur Eliminierung von infizierten Hepatozyten und zur Stimulation von B-Zellen zur Produktion neutralisierender Antikörper kommt. Neben der klassischen, in Mausmodellen häufig verwendeten, I.P.-Injektion, sollen zudem zwei alternative Applikationssysteme untersucht werden, die bei einer Zellpermeabilität des Vakzins möglich sein könnten: Die transdermale Gabe des Vakzins soll über Pflaster vermittelt werden, welche auf die rasierte Haut von Mäusen angebracht wird und durch Diffusion durch die Hautschichten Langerhans Zellen stimulieren soll. Das zweite System besteht aus der oral-mukosalen Gabe des Impfstoffs und der Aufnahme über die Mundschleimhäute der Mäuse. Das Vakzin könnte hierbei durch die Mukusschicht über die sogenannten M-Zellen diffundieren und dort von den APCs aufgenommen werden (**Abbildung 10**). Als Kontrolle für das Permeabilität-vermittelnde TLM der Capside werden Δ TLMcapside verwendet, welche kein TLM besitzen. Als Kontrolle für den Einfluss der Trägercapside soll das Antigen mSA_preS1/2 alleine, ohne Capside verwendet werden.

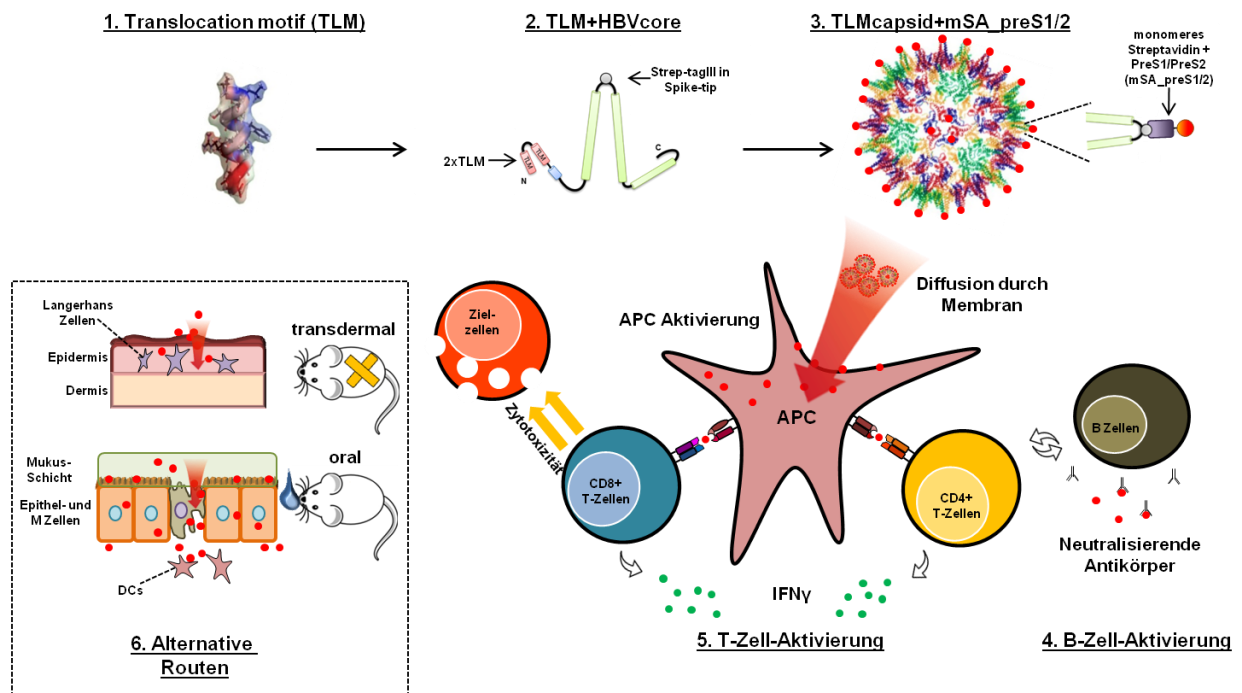


Abbildung 10: Zusammenfassung des Forschungsvorhabens. TLM-fusionierte HBVcapside (1. und 2.) sollen über Strep-tag-Streptavidin-Interaktion mit PreS1PreS2 als Antigen gekoppelt werden (3.). Nach I.P.-Injektion des Vakzins in Mäuse und soll geprüft werden, ob durch Diffusion der Partikel ins Zytoplasma von APCs, T- und B-Zellen zur Eliminierung infizierter Hepatozyten und Induktion der Produktion neutralisierender Antikörper aktiviert werden (4. und 5.). Aufgrund der Permeabilität der Capside soll zusätzlich eine orale und eine Pflaster-vermittelte transdermale Applikation untersucht werden (6.).

2 Material

2.1 Zellen

2.1.1 Prokaryotische Zellen

Stamm	Genotyp	Quelle
DH5-α	F– Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK–, mK+) phoA supE44 λ– thi-1 gyrA96 relA1	Invitrogen, Karlsruhe
Top10	F– <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80lacZΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara leu</i>) 7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (StrR) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen, Paisley, UK
Rosetta™(DE3)pLysS	F- ompT hsdSB(RB- mB-) gal dcm λ(DE3 [<i>lacI</i> <i>lacUV5-T7</i> gene 1 ind1 <i>sam7</i> <i>nin5</i>]) pLysSRARE (CamR)	Universität Hamburg
BL21(DE3)	F– ompT hsdSB(rB–, mB–) gal dcm (DE3)	Universität Hamburg

2.1.2 Eukaryotische Zellen

Stamm	Beschreibung	Quelle
HepG2	Humane Hepatomzelllinie	[256]
AML12	Murine Leberzelllinie	ATCC (ATCC® CRL-2254™)
HepAD38	Humane Hepatomzelllinie abgeleitet von HepG2 (beinhaltet 1,2-faches HBV-Genom (Serotyp ayw, Genotyp D))	[257]
HepaRG	Differenzierbare, humane Hepatomzelllinie	[258]

2.1.3 Murine primäre Zellen

Splenozyten und Lymphozyten wurden aus der Milz bzw. aus axillären, Subilium-, lumbal-aortischen, lateral-iliakalen, Kolik- und den kaudal-mesenterischen Lymphknoten von C57BL/6N Mäusen entnommen.

2.2 Mäuse

Für alle Immunisierungsexperimente wurden C57BL/6N Mäuse verwendet. Für Biodistributionsanalysen mittels *in vivo* Imaging wurden BALB/c Mäuse verwendet. Die Tiere stammen entweder vom zertifizierten Lieferanten Charles River, Freiburg oder aus den Tierställen des Paul-Ehrlich-Instituts, Langen.

2.3 Plasmide

#	Name	Beschreibung	Quelle
1	pET24d(+)	Für bakterielle Expressionssysteme	Novagen, Darmstadt
2	pRSET_6xHis_mSA(+PSAAS)_FLAG_EGFP	Insert: Hexahistidin-Tag für Reinigungszwecke, monomeres Streptavidin, FLAG-Tag und EGFP	Addgene plasmid # 39862, [259]
3	pRSET_6xHis_mSA(+PSAAS)_preS1/2	EGFP aus Plasmid #2 entfernt und durch HBV PreS1PreS2 gtD ersetzt	Tobias Zahn
4	pET24d(+)_2xTLM/HA/Core/StreptagIII	HBV Core (gt: ayw), HA-Tag für Detektionszwecke, 2xTLM für Zellpermeabilität, Strep-TagIII für Antigenbeladung und Reinigungszwecke	Sami Akhras
5	pET24d(+)_ΔTLM/HA/Core/StreptagIII	Plasmid #4 ohne TLM	Sami Akhras
6	pJo19_1.2x_HBV_gtD	1,2-faches HBV Genom, ayw, Genotyp D	Joachim Lupberger

2.4 Oligonukleotide

#	Name	Sequenz (5'→3')
234	T7_promoter_fwd	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
342	T7_terminator_rev	GGC AGC AGC CAA CTC AGC
1009	HindIII- M.streptavidin_fwd	AAA AAG CTT ATG GCA GAA GCA GGT ATT ACC GGC ACC TGG
1010	NotI-M.streptavidin_rev	AAA GCG GCC GCG CTA CCG CCA CC
1011	NotI-HBV-PreS1-PreS2- gtA_fwd	AAA GCG GCC GCT GGG ACG AAT CTT TCT G
1012	NotI-HBV-PreS1-PreS2- gtA_rev	AAA GCG GCC GCG TTC GTC ACA GGG TC
1013	NotI-HBV-PreS1-PreS2- gtD_fwd	AAA GCG GCC GCT GGG CAG AAT CTT TC
1014	NotI-HBV-PreS1-PreS2- gtD_rev	AAA GCG GCC GCG TTC AGC GCA GG
1091	BglII-PreS1/2_gtD_fwd	AAA AGA TCT GGG CAG AAT CTT TCC ACC AGC AAT CC
1092	HindIII-PreS1/2_gtD_rev	AAA AAG CTT GTT CAG CGC AGG GTC CCC AAT CCT C
1093	NcoI-M.streptavidin_fwd	AAA CCA TGG TTG CAG AAG CAG GTA TTA CCG GCA CC
1094	HindIII- M.streptavidin_rev	AAA AAG CTT GCT ACC GCC ACC GCC TGA AC
1095	HindIII-PreS1/2_gtD_fwd	AAA AAG CTT GGG CAG AAT CTT TCC ACC AGC AAT CC
1096	NotI-PreS1/2_gtD_rev	AAA GCG GCC GCG TTC AGC GCA G

2.5 Antikörper

2.5.1 Antikörper für Western Blot, Immunfluoreszenz und Histologie

2.5.1.1 Primärantikörper

Antikörper	Kat. #	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Anti-Hepatitis-B-Virus Core	MAB16990	Maus monoklonal	1:1000 in Milchpulver/TBST (WB)	Millipore TEMECULA CALIFORNIA
Anti-Hepatitis-B-Virus Core	B058601-8	Kaninchen polyklonal	1:200 in 5% BSA in TBST Puffer (IF)	Dako north America, inc.
Anti-Hepatitis-B-Virus LHBs	MA18/7	Maus monoklonal	1:600 in Odyssey Blocking Puffer (WB/IF)	[260]
Anti-His-Tag	sc-803	Kaninchen polyklonal	1:300 in Odyssey Blocking Puffer (WB)	Santa Cruz biotechnology, inc.
Anti-Hepatitis-B-Virus LHBs	K112	Kaninchen polyklonal	1:80 in Odyssey Blocking Puffer (Histologie)	Eigene Herstellung der Arbeitsgruppe

2.5.1.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Kat. #	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Anti-Maus-HRP	NXA931	Schaf	1:2000 in Milchpulver/TBST oder Odyssey Blocking Puffer	GE Healthcare, UK
Anti-Kaninchen-HRP	NA9340v	Esel	1:2000 in Roti-Block (WB)	GE Healthcare, UK
Anti-Maus-IRDye® 800CW	926-32212	Esel	1:5000 in Odyssey Blocking Puffer (WB)	LI-COR, Bad Homburg
Anti-Maus-IRDye® 680LT	926-68022	Esel	1:5000 in Odyssey Blocking Puffer (WB)	LI-COR, Bad Homburg
Anti-Kaninchen-IRDye® 680LT	926-68023	Esel	1:5000 in Odyssey Blocking Puffer (WB)	LI-COR, Bad Homburg

Anti-Maus IgG Alexa Fluor 488	A21206	Esel	1:1000 in 5% BSA in TBST Puffer (IF)	Invitrogen, Darmstadt
Anti- Kaninchen IgG Cy3	711-166-152	Esel	1:400 in 5% BSA in TBST Puffer (IF)	Jackson Immunoresearch, Westgrove, USA

2.5.2 Antikörper für FACS

Antikörper	Kat. #	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Anti-Maus- CD107a- Alexa Fluor 488	121607	Ratte	1:200 in Medium	Biolegend, USA
Anti-Maus- CD8b-APC	170083-81	Ratte	1:40 in MACS Puffer	eBioscience
Anti-Maus- CD8-FITC	100705	Ratte	1:40 in MACS Puffer	Biolegend, San Diego, USA
Anti-Maus- IFNγ-PE	505807	Ratte	1:10 in 0,1% Saponin/MACS Puffer	Biolegend, San Diego, USA
Anti-Maus- GranzymA- PE	149703	Ratte	1:80 in MACS Puffer	Biolegend, San Diego, USA

2.5.3 Antikörper für ELISA

Antikörper	Kat. #	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Anti-Maus- HRP	NXA931	Schaf	1:1000 in 10% FCS in PBS	GE Healthcare, UK

2.6 Größenmarker

Marker	Name	Hersteller
Proteinmarker	PageRulerTM Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Karlsruhe
Proteinmarker	PageRulerTM Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Karlsruhe

Nukleinsäuremarker	GeneRuler TM 1 kb DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Nukleinsäuremarker	GeneRuler TM 100 bp DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot

2.7 Enzyme

Enzym	Hersteller
Antarctic Phosphatase	NEB, Frankfurt am Main
Benzonase (100.000 U/vial)	Merck, Darmstadt
Taq DNA-Polymerase	Genaxxon bioscience
Restriktionsendonukleasen (HindIII, NotI, BglII, NcoI)	NEB, Frankfurt am Main
T4 DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
Lysozym	Carl Roth, Karlsruhe
Accutase	Merck Millipore, Schwalbach

2.8 Proteaseinhibitoren

Enzym	Endkonzentration	Hersteller
Aprotinin (Serinproteaseinhibitor)	10 µg/ml	Applichem
Leupeptin (Serin- und Cysteinproteaseinhibitor)	25 µg/ml	Applichem
Pepstatin A (Aspartatproteaseinhibitor)	20 µg/ml	Applichem
PMSF (Serinproteaseinhibitor)	1 mM	Applichem

2.9 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
1-Butanol	Merck, Darmstadt
Agarose	Genaxxon, Biberach/Riss
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe
Biotin-Fluorescein	Thermo Scientific, Karlsruhe
Brefeldin A	Sigma-Aldrich, Seelze
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA Fraktion V	PAA, Linz, AT
Chloramphenicol	Carl Roth, Karlsruhe
Collagen	Collaborative Biomedical Products, US
DAPI	Merck, Darmstadt
Desthiobiotin	Sigma-Aldrich, Seelze
Dexamethason	Gibco, USA
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Genaxxon BioScience, Ulm
dNTP-Mix	NEB, Frankfurt am Main
Essigsäure, 100% (v/v)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol, 100% (v/v)	Roth, Karlsruhe
FCS	Sigma Aldrich, Seelze
Formaldehyd 37% (v/v)	J.T. Baker, Deventer, NL

Glycerol 99.5%	GERBU Biotechnik, Gaiberg
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Guanidin-Hydrochlorid	Carl Roth, Karlsruhe
HCl	Carl Roth, Karlsruhe
Hydrocortison	Sigma-Aldrich, Seelze
Imidazol	Carl Roth, Karlsruhe
Immobilon western HRP substrate luminol reagent	Millipore Schwalbach
Immobilon western HRP substrate peroxidase solution	Millipore Schwalbach
Insulin	Sigma-Aldrich, Seelze
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropyl-β-D- Thiogalactopyranosid (IPTG)	Fermentas, St. Leon-Rot
Kanamycin	Carl Roth, Karlsruhe
Monensin	Sigma-Aldrich, Seelze
Mowiol	Sigma Aldrich, Seelze
N,N,N',N'- Tetramethylethylenedia mine (TEMED)	Merck, Darmstadt
Na₂HPO₄·2H₂O	Carl Roth, Karlsruhe
NaCl	Carl Roth, Karlsruhe
NaOH	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumpyruvat	Thermo Scientific, Karlsruhe
Penicillin	Carl Roth, Karlsruhe

Phalloidin– Tetramethylrhodamin B Isothiocyanate	Sigma-Aldrich, Seelze
Rhodamin	Sigma-Aldrich, Seelze
Roti®-Block	Carl Roth, Karlsruhe
Rotiphorese Gel 40 (29:1)	Carl Roth, Karlsruhe
Saponin	Sigma-Aldrich, Seelze
Selen	Gibco, USA
Streptomycin	Carl Roth, Karlsruhe
Sulfo-NHS-Cy7	Lumiprobe, Hannover
Supersignal West Pico Stable Peroxide Solution + Enhancer Solution	Thermo Scientific, Karlsruhe
Transferrin	Gibco, USA
TRIS	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich Seelze
Triton X-114	Sigma-Aldrich Seelze
Tween 20	Genaxxon, Biberach
Urea	Carl Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Seelze

2.10 Verbrauchsmaterial

Allgemeine Materialien	Hersteller
1,5 ml Tubes	Sarstedt, Nümbrecht
2 ml Tubes	Sarstedt, Nümbrecht
6-, 12-, 24- und 96-Well- Platten	Greiner Bio One, Frickenhausen
BD Microtrainer	BD Biosciences, USA
Centricon, Amicon Ultra-0.5 ml, 4 ml, 15 ml MWCO 10 kDa	Millipore, Schwalbach
Chirurgisches Einweg-Skalpell	B. Braun, Melsungen
Developer type E 1-3	C & L GmbH, Planegg
Dialysemembranen (MWCO 10.000 Da)	Spectrum Laboratories, USA
Dialysemembranen (MWCO 12.000-14.000 Da)	Spectrum Laboratories, USA
Einweg-OP-Mundschutz	Coldex, CH
Einweg-OP-Kittel	Coldex, CH
Fixer type F 1+2	C & L GmbH, Planegg
Hypercassette TM	GE Healthcare, Freiburg
Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Freiburg
Insulinspritze 0,5 ml Omnican mit Kanüle	B. Braun, Melsungen
IV-Katheter	BD Biosciences, USA
Mikroskop Deckgläschen	Carl-Roth, Karlsruhe
Mikroskop Objektträger	Carl-Roth, Karlsruhe
Nurses Caps Haarhauben	Barrier, S

Omnifix®-F Spritzen (1, 5, 10, 20 mL)	B. Braun, Melsungen
Pasteurpipetten	VWR, Darmstadt
Peptid-Array	Thomas Holzhauser
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Pflaster Backing	3M, Saint Paul, USA
Pflaster-Tape	3M, Saint Paul, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen mit Filter 2-100 µl, 20-300 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen mit Filter 100-1250 µl, 0,5-20 µl	Biosphere Filter Tips, VWR, Darmstadt
PVDF Membran	Merck Millipore, Schwalbach
RotiLabo® Spritzenfilter (0,22 / 0,45 µm)	Carl-Roth, Karlsruhe
Rundboden FACS Röhrchen	BD Biosciences, USA
Steritop GP Filtereinheit 1000 ml, 0.22 µm	Millipore, Schwalbach
Überschuhe	VWR, Darmstadt
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckman Coulter, Krefeld
Whatman-Papier	GE Healthcare, Freiburg
Zellschaber	TPP, CH
Zellsieb 70 µm	VWR International, Darmstadt
Zellkulturflaschen T25, T75, T175	Greiner Bio One, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen (15 und 50 ml)	Greiner Bio One, Frickenhausen

2.11 Puffer

2.11.1 Allgemeine Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	0,5 M EDTA pH 8
HEPES Puffer	1 M HEPES pH 7,4
Anodenpuffer I	20% Ethanol (v/v) 0,3 M Tris
Anodenpuffer II	20% Ethanol (v/v) 25 mM Tris
Kathodenpuffer	20% Ethanol (v/v) 40 mM 6-Aminohexansäure
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	136 mM NaCl 2,68 mM KCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 1,47 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,1
SDS-Ladepuffer (4x)	4% SDS (w/v) 125 mM Tris-HCl pH 6,8 10% Glycerol (v/v) 10% β-Mercaptoethanol (v/v) 0,02% Bromphenolblau (w/v)
SDS-Laufpuffer (10x)	0,25 M Tris 2 M Glycin 1% SDS (w/v) pH 8,3
Trenngelpuffer	1,5M Tris 0,4% SDS (w/v) pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris 0,4% SDS (w/v) pH 6,7
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)	0,2 M Tris 1 M Acetat 0,05 M EDTA pH 8,8
Lysogeny broth medium (LB)	1 % Trypton (w/v) 0,5 % Hefeextrakt (w/v) 1 % Natriumchlorid (w/v)
Tris-gepufferte Salzlösung + Tween 20 (TBS-T)	20 mM Tris pH 8,8 150 mM NaCl 0,05% Tween 20
MACS-Puffer	136 mM NaCl 2,7 mM KCl 8 mM Na ₂ HPO ₄

	1,47 mM KH_2PO_4 2mM EDTA 0,5% w/v BSA pH 7,2
Boratpuffer	0,1 M Borsäure pH 8,5
Lysepuffer für Bakterien	2,5 µl/ml Leupeptin 10 µl/ml PMSF 2 µl/ml Pepstatin 1 µl/ml Aprotinin 0,25 mg/ml Lysozym 0,05 µl/ml Benzonase

2.11.2 Puffer für Äkta

Puffer	Zusammensetzung
Strep-Tactin Affinitätschromatografie Laufpuffer	PBS pH 7,4
Strep-Tactin Affinitätschromatografie Elutionspuffer	PBS 2,5 mM Desthiobiotin pH 7,4
Entsalzung (Hitrap-Säule) Laufpuffer	PBS pH 7,1
Ni-NTA Affinitätschromatografie Solubilisierungspuffer (denaturierend)	6 M Guanidinhydrochlorid 100 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 mM Tris pH 8
Ni-NTA Affinitätschromatografie Equilibrierungspuffer (denaturierend)	6 M Urea 100 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 mM Tris 20 mM Imidazol pH 8
Ni-NTA Affinitätschromatografie Waschpuffer (denaturierend)	6 M Urea 100 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 mM Tris pH 6,3
Ni-NTA Affinitätschromatografie Puffer für Rückfaltung an der Säule (nativ)	PBS pH 7,4
Ni-NTA Affinitätschromatografie Elutionspuffer (nativ)	20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 500 mM NaCl 500 mM Imidazol, pH 7,4

2.11.3 Puffer für Reinigung von Inclusion Bodies

Puffer	Zusammensetzung
Lysepuffer	Tris-HCl 100 mM, pH 8 0.250 mg/ml Lysozyme 25 µg/ml Leupeptin 1 mM PMSF 10 µg/ml Aprotinin 20 µg/ml Pepstatin A
Waschpuffer	100 mM Tris-Cl, pH 7,0 5 mM EDTA 5 mM β-Mercaptoethanol 1 M Urea 1% (w/v) Tween 20
Waschpuffer für letzten Waschschrift	100 mM Tris-Cl, pH 7,0 5 mM EDTA 5 mM β-Mercaptoethanol 1 M Urea

2.12 Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
Ampicillin-Stocklösung	100 mg/ml
Chloramphenicol-Stocklösung	33 mg/ml
Kontrastierungsmittel für Elektronenmikroskopie I	2% Uranylacetat
Kontrastierungsmittel für Elektronenmikroskopie I	2% Wolfaramtophosphorsäure
Coomassielösung	0,5% Coomassie Brilliant Blau R250 25% Ethanol (v/v)
Entfärberlösung	25% Ethanol 10% Essigsäure
Isofluran	Baxter, USA
Kanamycin-Stocklösung	30 mg/ml
Sucroslösung	80-10% Sucrose in PBS

Rote-Blutzellen-Lysepuffer

150 mM NH₄Cl
10 mM Tris-HCl

2.13 Zellkulturmedien

Medium	Zellen	Hersteller	Zusammensetzung
LB-Agar nach Luria/Miller	<i>E. coli</i>	Paul-Ehrlich-Institut	1 % Trypton (w/v) 0,5 % Hefeextrakt (w/v) 1 % NaCl (w/v) pH 7,0
RPMI 1640, ohne Glutamin	Primäre Maus-Lymphozyten/ Splenocyten	Biowest, Nuaille, Frankreich	10% Hitze-inaktiviertes FCS 2 mM L-Glutamin 1 mM Natriumpyruvat 10 mM HEPES 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 0,1 mM β-Mercaptoethanol
Wachstumsmedium HepaRG: William's E Medium	HepaRG	Biochrom, Berlin	10% FCS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 5 µg/ml Insulin 50 µM Hydrocortison
Differenzierungsmedium HepaRG: William's E Medium	HepaRG	Biochrom, Berlin	Wachstumsmedium + 2% DMSO
DMEM	HepG2	Biowest, Nuaille, Frankreich	4,5g/L Glucose 10% FCS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin
1:1 DMEM:Ham's F12	AML12	Biowest, Nuaille, Frankreich / Sigma Aldrich, Seelze	2% Hitze-inaktiviertes FCS 40 ng/ml Dexamethason 10 µg/ml Insulin 5,5 µg/ml Transferrin 5 ng/ml Selen

2.14 Kits

Kit	Hersteller
QIAGEN plasmid maxi Kit	QIAgen, Hilden

QIAprep spin miniprep Kit	QIAgen, Hilden
QIAquick gel extraction Kit	QIAgen, Hilden
Endotoxin measurement (limulus amebocyte lysate, PTS Kartuschen 5-0,05 EU/ml)	Charles River
Pierce™ LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit	Thermo Scientific, Karlsruhe
Lipofectamin 3000 Transfectionsreagenz	Thermo Scientific, Karlsruhe
IFNγ Mouse ELISA Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Enzygnost® HBsAg 6.0, HBsAg-ELISA Kit	Siemens, Erlangen
Pierce™ High Capacity Endotoxin Removal Resin	Thermo Scientific, Karlsruhe

2.15 Geräte

2.15.1 Chromatografieanlagen und Säulen

Anlage	Hersteller
ÄKTA Purifier 10	GE Healthcare, Freiburg
Säule	Hersteller
HisTrap HP, 1 ml	GE Healthcare, Freiburg
HisTrap HP, 5 ml	GE Healthcare, Freiburg
StrepTrap HP, 5 ml	GE Healthcare, Freiburg
HiTrap Desalting, 5 ml	GE Healthcare, Freiburg

2.15.2 Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie

Biacore T200	GE Healthcare, Freiburg
--------------	-------------------------

2.15.3 PCR-Cycler

Mastercycler gradient

Eppendorf, Hamburg

2.15.4 Durchflusszytometrie

CytoFlex

Beckman Coulter, Krefeld

LSRII SORP flow cytometer

BD Biosciences, Heidelberg

2.15.5 Elektrophorese

Produkt	Hersteller
Elektrophorese Netzteil EPS301	GE Healthcare, Freiburg
Horizontales Elektrophoresesystem HE33	GE Healthcare, Freiburg
SE250 Series Elektrophoreseeinheit	GE Healthcare, Freiburg
Semidry blotting chambers TE77	GE Healthcare, Freiburg
Standard power pack P25	Biometra, Göttingen

2.15.6 Zentrifugen

Zentrifuge	Hersteller
Sorvall RC5C plus	Thermo Scientific, Karlsruhe
Ultracentrifuge Optima L-70	Beckman Coulter, Krefeld
Ultracentrifuge Optima L-80 XP	Beckman Coulter, Krefeld
Avanti J-26 XPI	Beckman Coulter, Krefeld
Heraeus Fresco 17	Thermo Scientific, Karlsruhe
Ultracentrifuge Optima™ Max-XP	Beckman Coulter, Krefeld
Heraeus multifuge 1 S-R	Thermo Scientific, Karlsruhe

Mini spin plus	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Heraeus Cryofuge 8500	Thermo Scientific, Karlsruhe

2.15.7 Photometer

Gerät	Hersteller
NanoDrop One	Thermo Scientific, Karlsruhe
DU 730 UV/Vis-Spektrometer	Beckman Coulter, Krefeld

2.15.8 Mikroskopie

Mikroskop	Hersteller
LSM 510 META	Zeiss, Jena
EM 109	Zeiss, Jena
Axiovert 40C	Zeiss, Jena
Nikon Ti-U E20L80	Nikon Metrology GmbH, Alzenau
Leica TCS SP8	Leica Microsystems, Wetzlar

2.15.9 pH-Meter

S20 - SevenEasy™ pH

Mettler Toledo

2.15.10 Zellaufschluss

Ultraschall Homogenisator HD2200

Bandelin GmbH, Berlin

2.15.11 Geräte zur Bildgebung von Western blots

Gerät	Hersteller
AGFA Curix60 Film Entwickler	AGFA, Köln
C-DiGit Chemiluminescence Western Blot Scanner	LI-COR, Bad Homburg
Odyssey Imaging System	LI-COR, Bad Homburg

2.15.12 Inkubatoren, Schüttler und Heizblöcke

Gerät	Hersteller
CO2-Inkubator BBD 6220	Thermo Scientific, Karlsruhe
Incubator series B	Binder, Tuttlingen
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Roller mixer Stuart SRT9	Bibby Scientific, UK
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, USA
Rocking Platform WT16	Biometra, Göttingen
Shaker Polymax 2040	Heidolph, Schwabach
Shaker Promax 1020	Heidolph, Schwabach
Shaker Duomax 1030	Heidolph, Schwabach
Mixer and heater IKA RCT classic	IKA, Staufen

2.15.13 Kryomikrotom

Mikrotom-Kryostat HM 500 OM

Microm Heidelberg, Heidelberg

2.15.14 *In-vivo*-Imaging

IVIS Imaging System 200

Caliper Life Sciences, USA

2.15.15 Andere Geräte

Gerät	Hersteller
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
INTAS-Imaging System	Intas Science Imaging, Göttingen
Sterile Werkbank SterilGard®III Advance	The Baker Company, ME, USA
Sterile Werkbank SterilGard®II Type A/B3	The Baker Company, ME, USA
Tecan Infinite M1000	Tecan Group Ltd., Switzerland
Wasserbad	Memmert, Schwabach
2.15.16 Software	
Programm	Hersteller
Unicorn 5.31	GE Healthcare, Freiburg
Adobe Photoshop CS6	Adobe, San Jose, USA
Vector NTI	Life Technologies, Darmstadt
Image Studio Light	LI-COR, Bad Homburg
ZEN 2012	Carl Zeiss AG, Jena
CytExpert	Beckman Coulter, Krefeld

GraphPad Prism 7	GraphPad, USA
Biacore T200 control	GE Healthcare, Freiburg
Biacore T200 evaluation	GE Healthcare, Freiburg
Tecan i-control	Tecan Group Ltd., Switzerland
Living Image	Caliper Life Sciences, USA

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Prokaryotische Zellkultur

Die Zellen der *E. coli*-Stämme Rosetta (DE3), BL21 (DE3), DH5- α oder TOP10 wurden bei 37°C in LB-Medium unter Schütteln für 16 h kultiviert. Zur Selektion wurde je nach verwendetem Stamm und transformiertem Plasmid entsprechendes Antibiotikum zugesetzt. Zur Bereitung von Glycerolstocks wurden 40% Glycerol zugefügt und die Bakterien bei -80°C gelagert.

3.1.2 Eukaryotische Zellkultur

Die humane Leberkrebszelllinie HepG2 wurde in DMEM Komplettmedium bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Alle zwei Tage wurde das Medium entfernt und die Zellen mit warmem PBS-Puffer gewaschen. Zum Loslösen adhärenter Zellen wurde Trypsin/EDTA für 5 min bei 37°C zugesetzt. Zum Neutralisieren der Trypsinaktivität wurde Medium zugegeben und die Zellen erneut verdünnt ausgesät.

Die murine Leberzelllinie AML12 wurde in 1:1 DMEM:Ham's F12 mit 2% hitzeinaktiviertem FCS und Primary Hepatocyte Maintenance Supplements von Gibco bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Das Medium wurde alle zwei Tage abgenommen und die Zellen mit warmem PBS-Puffer gewaschen. Die adhärenenten Zellen wurden in Accutase für 15 min bei 37°C inkubiert und nach Abnahme wieder verdünnt ausgesät.

Die HBV-permissive Hepatomzelllinie HepaRG wurde für zwei Wochen in HepaRG-Wachstumsmedium bei 37°C und 5% CO₂ und anschließend in HepaRG-Differenzierungsmedium bei 37°C und 5% CO₂ für weitere zwei Wochen kultiviert. Alle zwei Tage wurde das jeweilige Medium erneuert.

3.1.3 Primärzellkultur

Lymphozyten von C57BL/6N Mäusen wurden unter sterilen Bedingungen aus Lymphknoten isoliert. Dazu wurden die Lymphknoten durch ein 70 μ m Zellsieb in RPMI1640 Komplettmedium mit 2% hitzeinaktiviertem FCS gedrückt und bei 300 g für 5 min in einem 15 ml Falcontube zentrifugiert, um die Fettphase abzutrennen. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ in RPMI1640 Komplettmedium kultiviert.

Splenozyten von C57BL/6N Mäusen wurden unter sterilen Bedingungen aus der Milz isoliert. Die Milz wurde hierzu mit einem Skalpell in kleine Stücke zerschnitten und durch ein 70 μ m Zellsieb in RPMI1640 Komplettmedium mit 2% hitzeinaktiviertem FCS gedrückt. Anschließend wurden sie bei 300 g für 5 min in einem 15 ml Falcontube zentrifugiert, der

Überstand dekantiert und für 1 min mit 1 ml Rote-Blutzellen-Lysepuffer bei Raumtemperatur inkubiert, um Erythrozyten zu lysieren. Die Zellen wurden schließlich dreimal mit Medium gewaschen und die benötigte Zellzahl angepasst.

3.1.4 *Ex vivo* Pflaster-vermittelte Hautschichtenmigration

Zum Zwecke der Analyse, inwiefern TLMcapside, beladen wie unbeladen, in der Lage sind, durch die Permeabilitäts-vermittelnden Eigenschaften des TLM durch einzelne Hautschichten zu migrieren, wurde ein *ex vivo* Transdermalsystem entwickelt. Nach dem Entfernen eines 1 cm² großen Hautstücks aus C57BL/6N wurde dieses in eine Petrischale gelegt und bis zur vertikalen Hälfte der Haut mit RPMI1640 Komplettmedium gefüllt, um ein Austrocknen und Schrumpfen zu verhindern. Gleichzeitig wurde die äußerste Hautschicht trocken gehalten. Auf diese wurde entweder 100 µg/ml TLMcapside, 100 µg/ml ΔTLMcapside, 40 µg/ml mSA_preS1/2 oder Capside gekoppelt mit mSA_preS1/2, in den jeweiligen Konzentrationen, in einem Volumen von 25 µl pipettiert. Die Proteinlösung wurde mit einem Transdermal-Pflaster-System überdeckt. Dieses besteht aus einem *Backing*, welches die Verdampfung der Lösung verhindert und einem *Tape* zur Fixierung des *Backings* auf der Haut (**Abbildung 11**).

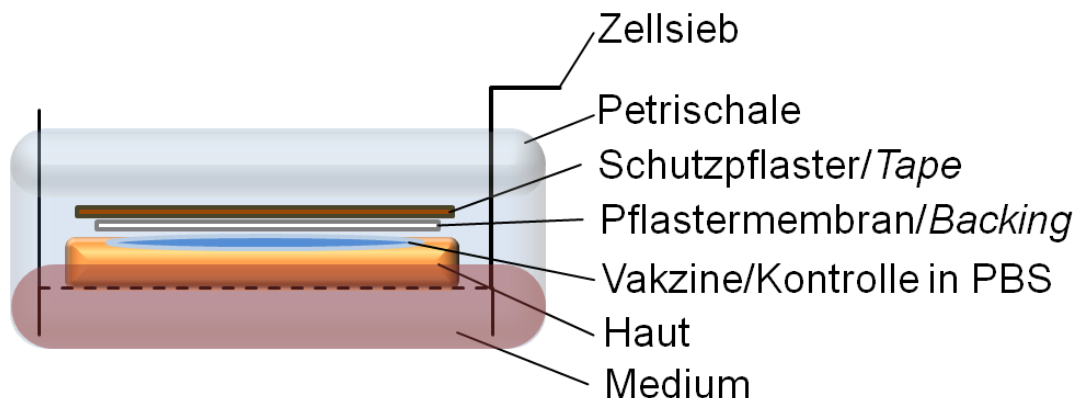


Abbildung 11: *Ex vivo* Transdermal-Pflaster-System. Zur Analyse der Proteinmigration durch Hautschichten wurde 1cm² Haut einer C57BL/6N Maus in einer Petrischale in Medium gelegt und mit den jeweiligen Proteinen inkubiert. Um der Verdampfung der Probe entgegenzuwirken wurden die Lösungen mit einer Membran, dem *Backing*, und einem Schutzpflaster, dem *Tape*, fixiert.

Nach 6 h Inkubation bei 37°C wurden die Hautstücke dreimal mit PBS gewaschen und schließlich mit Hilfe eines Mikrotoms vertikal in 10 µm dicke Scheiben geschnitten. Die Schnitte wurden auf ein Gelatine-überzogenes Deckglas gelegt und für 30 min getrocknet. Nach einer Fixierung der Proben in 3,7% Formaldehyd für 20 min wurden diese für 20 min mit 1% Triton X-100 permeabilisiert und mit HBVcore- und HBsAg-spezifischen Antikörpern gefärbt, um die migrierten Proteine in den unterschiedlichen Hautschichten mittels indirekter

Immunfluoreszenzfärbung sichtbar zu machen (siehe 3.3.9). Um die unterschiedlichen Hautschichten erkennbar zu machen, wurden diese zusätzlich mit DAPI und Phalloidin-633 inkubiert.

3.1.5 *In vitro* HBV-Infektionsmodell

HBV wurde aus dem Überstand von HBV-exprimierenden HepAD38 Zellen isoliert. Dazu wurde der Zellkulturüberstand gesammelt und die Zellbestandteile durch Zentrifugation bei 4000 g, 4°C für 15 min und durch Sterilfiltration mit 0,45 µm Filtereinheiten entfernt. Das Virus wurde durch Zugabe von 6% PEG8000 unter Rühren für 2 h bei 4°C und nachfolgender Zentrifugation bei 12000 g für 30 min bei 4°C präzipitiert. Das entstandene Pellet wurde anschließend in 25% FCS in PBS in 1/100 des Originalvolumens resuspendiert und bei -80°C gelagert. Die Kopienzahl des Virus wurde mittels qPCR bestimmt.

Differenzierte HepaRG-Zellen wurden anschließend mit einer MOI=1 für 16 h bei 37°C in der Anwesenheit von 4% PEG8000 inkubiert. Danach wurden die Zellen mindestens viermal mit PBS gewaschen und für insgesamt 14 Tage in Differenzierungsmedium kultiviert. Zur Überwachung der Infektion wurden alle zwei Tage Proben aus dem Zellkulturüberstand genommen und mittels HBsAg-ELISA auf HBsAg im Überstand getestet (siehe 3.4.3).

3.1.6 *In vitro* Infektionsneutralisation durch neutralisierende Antikörper

Zum Testen auf neutralisierende Antikörper im Serum immunisierter Mäuse wurden diese mit HBV (MOI=1) in HepaRG-Differenzierungsmedium in den Verdünnungen 1:20, 1:50, 1:100 und 1:500 proportional zum Volumen an Medium für 2 h bei 37°C vorinkubiert. Das Serum mit Virus wurde anschließend zu HepaRG-Zellen gegeben, wie in 3.1.5 beschrieben. Während einer zwei-wöchigen Infektionszeit wurden jeweils an den Tagen 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 und 14 zu Analyse Zwecken Überstände genommen und durch frisches Medium ersetzt. Durch einen HBsAg-ELISA wurde die Menge an HBsAg in den Überständen gemessen.

3.1.7 *In vitro* Zytotoxizitäts-Assay primärer, muriner Lymphozyten und Splenozyten

Nach der Immunisierung von Wildtyp C57BL/6N Mäusen mit dem Vakzin und Kontrollen (siehe 3.5.2) wurden die isolierten Lymphozyten oder Splenozyten (siehe 3.1.3 und 3.5.4) zur Analyse auf HBV-spezifische Zytotoxizität gegen HBV-positive Zielzellen getestet. Als Zielzellen wurde die murine Hepatozytenzelllinie AML12 mit 100.000 Zellen/Well in 12-Well-Platten in AML12-Medium ausgelegt und mit einem 1.2xHBV gtD Konstrukt transfiziert. Nach 72 h wurden die adhärennten Zellen mittels Accutase abgenommen und in 24-Well-Platten transferiert, auf deren Boden Deckgläschen gelegt wurden, um die Zellen später mit indirekter Immunfluoreszenzfärbung zu analysieren (siehe 3.3.9). Nach weiteren 24 h wurden die isolierten Splenozyten oder Lymphozyten mit den Zielzellen in AML12-Medium in

einem Verhältnis von 1:10 (Effektorzellen:Zielzellen) bei 5% CO₂ und 37°C kokultiviert. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurde der Überstand gesammelt und die suspendierten Lymphozyten bzw. Splenozyten durch Zentrifugation bei 300 g für 10 min abgenommen. Der Überstand wurde weiterhin zur Detektion von extrazellulärem IFN γ genutzt und die AML12 Zellen für indirekte Immunfluoreszenzfärbung gefärbt, um den Anteil verbleibender, HBV-positiver Zellen zu bestimmen. Zusätzlich wurden die Lymphozyten bzw. Splenozyten mittels FACS-Färbung auf intrazelluläres IFN γ untersucht (siehe 3.4.1).

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Transformation kompetenter Bakterien

Kompetente *E. coli* Bakterien wurden aus -80°C zum Auftauen für 10 min auf Eis gelagert und anschließend mit 100 ng Plasmid transformiert. Dazu wurde die Mischung aus Zellen und DNA für 20 min auf Eis gekühlt, für 60 s bei 42°C inkubiert (*heat-shock*) und schließlich weitere 5 min auf Eis gelagert. Es wurde 500 μ l LB-Medium ohne Antibiotikum zugegeben und die Zellen bei 37°C für 1,5 h unter Schütteln kultiviert. Danach wurde die Suspension bei 5000 rpm für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und das Pellet in 100 μ l frischem LB-Medium resuspendiert. Die Bakterien wurden anschließend auf Agarplatten mit entsprechend selektivem Antibiotikum ausgestrichen.

3.2.2 Isolation von Plasmid DNA

Die transformierten Zellen wurden in 250 ml oder 500 ml LB Medium bei 37°C für 16 h unter Schütteln kultiviert und anschließend bei 5000 rpm für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Die Plasmid DNA wurde aus dem Pellet mithilfe des QIAGEN Plasmid Maxi Kit nach Herstellerangaben extrahiert.

3.2.3 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Mithilfe des NanoDrop One wurde die Qualität und Quantität der Nukleinsäure bestimmt. Dazu wurden 2 μ l zur Konzentrationsbestimmung durch eine Absorptionsmessung bei $\lambda=260$ nm verwendet. Eine Absorption/Extinktion von 1,0 entspricht einer Konzentration von 50 μ g/ml doppelsträngiger DNA. Die Reinheitsbestimmung wurde durch eine Messung bei $\lambda=280$ nm durchgeführt. Das Verhältnis zwischen A_{260}/A_{280} sollte dabei einen Wert von etwa 1,8 ergeben. Werte niedriger als 1,8 sprechen in der Regel für Proteinkontaminationen.

3.2.4 Restriktionsendonukleaseverdau

Zum Zwecke der Klonierung wurde die Plasmid DNA durch Restriktionsendonukleasen verdaut. Dazu wurden 10 μ g DNA mit 10-20 Units Endonukleaseenzymen in geeignetem,

Enzym-abhängigem Puffer für 2 h bei 37°C verdaut. Die zerschnittene Plasmid DNA wurde anschließend mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (siehe 3.2.5) und für weitere Zwecke verwendet.

3.2.5 Agarosegelelektrophorese

Um PCR-Produkte nach Amplifikation oder verdauten Plasmide zu reinigen und deren Qualität abzuschätzen, wurde die Agarosegelelektrophorese für eine größenabhängige Auftrennung des Probenmaterials verwendet. Dazu wurde Agarose als 1% (w/v)-Lösung in 1x TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst. Nach kurzem Abkühlen wurde 0,1 µg/ml Ethidiumbromid hinzugefügt und die Lösung in eine horizontale Gelkammer geschüttet. Zusätzlich wurde ein Kamm in das verflüssigte Gel gesetzt, um Probentaschen in dem später verfestigten Gel zu erzeugen. Das feste Gel wurde anschließend in eine Gelkammer gegeben, welche mit 1x TAE-Puffer gefüllt war. Die zu analysierenden Proben wurden mit 6x Ladepuffer versetzt und in die vorbereiteten Taschen geladen. Nach einer Auftrennung bei 80-100 V wurden die Banden durch Bestrahlung mit UV-Licht (254/365 nm) sichtbar gemacht.

3.2.6 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Nach einer Auftrennung der PCR-Produkte und des verdauten Plasmids in 1% Agarosegelen wurden die gewünschten Banden aus dem Gel ausgeschnitten. Mithilfe des QIAquick Gel Extraction Kits wurden die DNA-Fragmente nach Herstellerangaben extrahiert. Zur Elution der DNA wurden 25 µl ddH₂O verwendet.

3.2.7 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Um eine Autoligation der verdauten Vektor-DNA zu verhindern, wurde das 5'-Phosphat der Vektor-DNA mithilfe einer Antarctic phosphatase (NEB) entfernt. Die Durchführung fand gemäß Herstellerangaben statt.

3.2.8 Ligation von DNA

Um DNA-Fragmente mit kompatiblen Enden zu ligieren, wurde eine T4 DNA Ligase verwendet. Die Ligation wurde in einem Reaktionsvolumen von 10 µl für 2 h bei Raumtemperatur gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

3.2.9 DNA-Sequenzierung und Analyse

Zur Überprüfung der korrekten Sequenz von klonierten Plasmiden wurden etwa 2 µg der klonierten DNA durch die SeqLab Labore in Göttingen sequenziert. Die benötigten Primer wurden aus der geschäftseigenen Primerbibliothek ausgewählt. Nach der Sequenzierung wurden die Ergebnisse mittels der Software Vector NTI Suite von Invitrogen, Karlsruhe analysiert.

3.2.10 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für das Amplifizieren von DNA-Fragmenten wurde eine Taq-DNA-Polymerase in einem Reaktionsvolumen von 25 µl verwendet. Zu 1 Unit Taq-DNA-Polymerase wurden 100 ng DNA, 1 µM *forward primer*, 1 µM *reverse primer*, 0,4 mM Desoxynukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; NEB), 1x Polymerasepuffer E und ddH₂O gegeben. Die Polymerasekettenreaktion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

1. Erste Denaturierung für 10 min, 95°C
2. Denaturierung für 30 s, 95°C
3. Annealing für 30 s, 55-58°C
4. Elongation für 1 min/kb DNA, 72°C
5. Extension für 10 min, 72°C

Die Schritte 2 bis 4 wurden insgesamt 30-mal wiederholt.

3.2.11 Kolonie-PCR

Nach erfolgter Klonierung und Transformation von kompetenten Bakterien wurden die positiven, bakteriellen Klone, welche das transformierte Plasmid beinhalteten, über eine Kolonie-PCR identifiziert. Dazu wurden einzelne Kolonien von der Agarplatte gepickt und in ein 25 µl PCR-Reaktionstube überführt und eine PCR durchgeführt. Positive Klone wurden daraufhin in 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum inokuliert und Übernacht bei 37°C inkubiert. Danach folgte eine Plasmidextraktion.

3.2.12 Transfektion

Für die Transfektion von AML12 Zellen mit dem HBV-Konstrukt 1.2xHBV_gtD wurde Lipofectamin 3000 von ThermoFisher nach Herstellerangaben verwendet. Nach 72 h wurden die Zellen für weitere Zytotoxizitätsanalysen weiterverwendet (siehe 3.1.7).

3.2.13 Klonierung von pRSET_mSA_preS1_preS2 zur Expression von mSA_preS1/2

Zur Klonierung eines bakteriellen Expressionsvektors, welcher für monomeres Streptavidin fusioniert mit den Domänen preS1 und preS2 von HBV gtD kodiert, wurde der *high-copy* Expressionsvektor pRSET-mSA-EGFP als Vorlage verwendet [259]. Durch Nutzen der Restriktionsschnittstellen BamHI (559) und HindIII (1314) wurde EGFP des Vektors durch HBV gtD preS1 (im Folgenden kursiv) und preS2 ersetzt (*G Q N L S T S N P L G F F P D H Q L D P A F R A N T A N P D W D F N P N K D T W P D A N K V G A G A F G L G F T P P H G G L L G W S P Q A Q G I L Q T L P A N P P P A S T N R Q S G R Q P T P L S P P L R N T H P Q A M Q W N S T T F H Q T L Q D P R V R G L Y F P A G G S S S G T V N P V L T T A S P L S S I F S R I G D P A L N*). Das klonierte Plasmid weist zudem einen 6xHis-tag am N-Terminus auf, welcher für die Reinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatografie

verwendet wurde (siehe 3.3.4). Das Plasmid wird als pRSET_mSA_preS1_preS2 bezeichnet und wurde in kompetente *E. coli* BL21 (DE3) transformiert, zur Produktion des Proteins mSA_preS1/2.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Produktion rekombinanter Proteine

Transformierte *E. coli* BL21 (DE3) wurden über Nacht für 16 h bei 37°C in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum unter Schütteln kultiviert. Es wurden je 50 ml Übernachtskultur zur Inokulation von 2 L LB-Medium verwendet und bei 37°C kultiviert bis die angeimpfte Kultur eine $OD_{600}=0,5$ erreicht hatte. Nach Hinzufügen von IPTG zu einer Endkonzentration von 1 mM wurde die Kultur unter Schütteln bei 37°C für weitere 4 h kultiviert. Schließlich wurde die Kultur bei 4°C, 5000 rpm für 15 min abzentrifugiert und in PBS (pH=7,1) aufgenommen. Die Suspension wurde in 50 ml Falcontubes überführt und erneut bei 4°C, 4700 rpm für 20 min zentrifugiert. Die entstandenen Pellets wurden daraufhin entweder bei -20°C gelagert oder direkt weiterverarbeitet.

3.3.2 Zellaufschluss

Pro Pellet wurden 10 ml PBS mit Proteaseinhibitoren (Leupeptin, PMSF, Pepstatin und Aprotinin) sowie 0,25 mg/ml Lysozym und 0,05 µl/ml Benzonase zugegeben und auf Eis resuspendiert. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die Proben für 20 min auf einen Roller gelegt und nachfolgend nochmals für 5 min auf Eis inkubiert. Die Bakterienzellen wurden bei 30% Leistung in sechs 20s-Zyklen sonifiziert. Die Sonifizierung fand durchgehend auf Eis statt. Nach dem Zellaufschluss wurden die Proben für 30 min bei 20.000 rpm abzentrifugiert.

3.3.3 Reinigung von *Inclusion Bodies*

Da der Großteil der Menge an exprimiertem mSA_preS1/2 als unlösliche Fraktion in Form von Einschlusskörperchen (*Inclusion Bodies*) vorliegt, wurde vor einer Affinitätschromatografie eine Reinigung durchgeführt. Dazu wurden die Pellets nach Zellaufschluss (3.3.2) in *Inclusion-Body-Puffer* mit 1 M Urea und 1% (w/v) Tween20 resuspendiert und gelöst. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 4°C, 20.000 rpm für 30 min, wurde der Überstand dekantiert und das Pellet erneut in *Inclusion-Body-Puffer* gelöst. Diese Reinigungsschritte wurden insgesamt viermal durchgeführt, bevor das Pellet im Anschluss mit PBS (pH=7,1) gewaschen wurde, um Rückstände des Puffers zu entfernen. Für die nachfolgende Reinigung durch Ni-NTA-Affinitätschromatografie wurden die Pellets in Guanidinhydrochlorid-Puffer gelöst und 25 mM Imidazol hinzugegeben. Die Proteinlösung

wurde für 2 h bei Raumtemperatur auf einen Roller gegeben und schließlich für 10 min bei 4°C, 4700 rpm abzentrifugiert. Der Überstand mit gelösten *Inclusion Bodies* von mSA_preS1/2 wurde für die Affinitätschromatografie verwendet.

3.3.4 Chromatografie

Alle abgebildeten Chromatogramme der Proteinreinigung, durchgeführt mit dem ÄKTA Purifier, zeigen Milli-Absorptionseinheiten (milli absorbance units, mAU) auf der y-Achse und das Volumen der mobilen Phase in ml auf der x-Achse. Die Absorption wurde bei verschiedenen Wellenlängen gemessen und ist wie folgt dargestellt: 280 nm (Absorption aromatischer Aminosäuren) in blau, 254 nm (Absorption von Nukleinsäuren) in rot und 215 nm (Absorption von Peptidbindungen) in rosa. Zudem werden die prozentuale Leitfähigkeit (hellblau) sowie die relative Konzentration des Puffers B (sekundärer Puffer) (gelb-grün) dargestellt.

3.3.4.1 Ni-NTA-Affinitätschromatografie mit Rückfaltung denaturierter Proteine auf der Säule

Zur Reinigung 6xHistidin-markierter Proteine unter denaturierenden Bedingungen, wie mSA_preS1/2, wurde eine HisTrap HP 5 ml Säule verwendet. Die Säule besteht aus hochvernetzten 6%-Agarosebeads, auf welche eine Chelatgruppe mit Ni²⁺-Ionen immobilisiert ist, und hat eine Bindekapazität von 40 mg Protein/ml Medium. Die Histidine der Proteine besitzen einen Imidazolring, welcher an die Ni²⁺-Ionen bindet und somit für die Anlagerung an die Säule verwendet werden kann. Durch Zufügen von geringen Konzentrationen an Imidazol kompetitiert dieses mit dem Histidin um die Bindung mit den Ni²⁺-Ionen. Da der 6xHis-tag der rekombinanten Proteine stärker bindet als natürlich vorkommendes Histidin in den Wirtsproteinen, werden letztere von der Säule abgewaschen, während die Proteine mit 6xHis-tag weiterhin binden. Nach dem Equilibrieren der Säule mit Equilibrierungspuffer und dem Laden der zu reinigenden Probe auf die Säule werden unspezifisch oder schwach gebundene Proteine durch Waschen mit dem fünffachen Säulenvolumen (*column volume*, CV) an Waschpuffer entfernt. Das Protein ist nun in denaturierter Form an der Säule gebunden. Für eine Rückfaltung in die native Konformität wurde ein Gradient mit PBS (pH=7,2) mit einer Geschwindigkeit von 0,25 ml/min für mindestens 120 min über die Säule gegeben. Nach Erreichen von 100% an PBS wurde die Zugabe noch für weitere 30 min beibehalten. Um die 6xHis-markierten Proteine nun von der Säule zu eluieren, wurde die Konzentration an Imidazol auf 250 mM erhöht und Elutionspuffer für eine native Reinigung hinzugegeben – diese hohe Konzentration an Imidazol führt zu einer Konkurrenz mit der spezifischen Bindung der Proteine und damit zur Elution des zu reinigenden Proteins. Die Proteinfraktionen wurden zu je 500 µl in

Eppendorftubes gesammelt. Im Folgenden wurde die Konzentration der Proteinlösung bestimmt (3.3.16) und per SDS-PAGE analysiert (3.3.7). Nach erfolgter Reinigung wurde die Säule mit fünf CV destilliertem Wasser gewaschen und mit fünf CV 20% Ethanol equilibriert und gelagert.

3.3.4.2 Streptactin-Affinitätschromatografie

Zur nativen Reinigung von TLMcore und Δ TLMcore, welche ein Strep-tagIII in ihrer *Spike-Tip* Region besitzen, wurde eine Streptactin-Affinitätschromatografie durchgeführt. Die verwendete StrepTrap HP 5 ml Säule ist mit vernetzter 6%-Agarose gepackt und besitzt Streptactin als Liganden. Nach einer Equilibrierung der Säule mit fünf CV PBS (pH=7,4) wurde die zu reinigende Proteinlösung nach nativer Aufbereitung (siehe 3.3.2) auf die Säule geladen. Nach der Zugabe der Probe wurde nochmals mit 10 CV PBS (pH=7,4) gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine von der Säule zu entfernen. Die spezifisch-gebundenen Strep-tagIII-markierten Proteine wurden durch Zugabe von 2,5 mM Desthiobiotin in PBS (pH=7,4) eluiert und zu je 500 μ l in Eppendorftubes fraktioniert. Die einzelnen Fraktionen wurden per SDS-PAGE analysiert und ihre Proteinkonzentration bestimmt. Nach erfolgter Reinigung wurde die Säule zunächst mit dreifachem CV destilliertem Wasser, dreifachem CV 0,5 M NaOH und wieder fünffachem CV destilliertem Wasser regeneriert. Zur Lagerung wurde die Säule mit fünffachem CV 20% Ethanol equilibriert und darin gelagert.

3.3.4.3 Pufferaustausch und Entsalzung

Zum Austausch eines Puffers einer Proteinlösung wurde die Hitrap Desalting 5 ml Säule von GE Healthcare verwendet, welche mit vernetztem Sephadex G-25 Dextran gepackt ist. Beispielsweise wurde mithilfe der Säule verbliebenes Desthiobiotin aus der Elution von TLMcore und Δ TLMcore entfernt (3.3.4.2), damit dies nicht die Wechselwirkung zwischen Strep-tagIII der Capside und Streptavidin des mSA_preS1/2 stört. Weiterhin wurde damit freies Cy7 von an Proteinen gebundenem Cy7 nach dem Koppeln (beschrieben in 3.3.19) abgeschieden. Die Säule hat eine Fraktionierungsspanne für globuläre Proteine mit einem Molekulargewicht (M_r) von 1000 bis 5000 und einer Ausschlussgrenze von M_r 5000. Es wurden je Lauf maximal 500 μ l Probe auf die Säule geladen und die Fraktionen gesammelt, um die Proteinkonzentration zu bestimmen und die Proben per SDS-PAGE zu analysieren. Nach Beendigung der Läufe wurde die Säule mit dem fünffachen CV destilliertem Wasser gewaschen und schließlich mit fünffachem CV Ethanol equilibriert und gelagert.

3.3.5 Assemblierung von TLMcore zu TLMcapsiden

Nach der Produktion und Reinigung von TLMcore wurde zu dessen PBS-Puffer (pH=7,4) zusätzlich NaCl aus einer 5 M Stammlösung auf eine Gesamtmolarität von 400 mM zugegeben. Die Erhöhung der Ionenstärke führt zur Assemblierung der TLMcore-Proteine zu TLMcapsiden. Dazu wurde die Proteinlösung über Nacht bei 4°C auf einem Rollertisch mit NaCl inkubiert.

3.3.6 LPS-Entfernung aus gereinigten Proteinen

Um Rückstände von Lipopolysacchariden aus der bakteriellen Expression der Proteine zu entfernen, wurde das Pierce High Capacity Endotoxin Removal Resin von Thermo Fisher verwendet. Dazu wurde ein Volumen an Beads in Eppendorftubes gegeben, welches der Hälfte des Volumens der Proteinlösung entspricht, aus dem das Endotoxin entfernt werden sollte. Die Beads wurden 1 min bei 500 g abzentrifugiert und zweimal mit ddH₂O gewaschen. Anschließend wurden die Beads in 0,2 N NaOH in 95% Ethanol für 2 h regeneriert. Nach einem zweifachen Waschschriff mit 2 M NaCl wurde fünfmal mit PBS (pH=7,4) gewaschen und die Proteinlösung für 2 h bei 4°C unter leichtem Schütteln mit den Beads inkubiert. Danach wurden die Beads bei 500 g für 2 min abzentrifugiert und der Überstand entnommen. Um sicherzustellen, dass keine einzelnen Beads in der Lösung verbleiben, wurde der Überstand nochmal bei 500 g für 2 min abzentrifugiert und anschließend mit Rotilabo Sterilfiltern mit einer Porengröße von 0,22 µm sterilfiltriert. Die Menge an verbliebenem Endotoxin wurde mithilfe des Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit bestimmt. Hierbei wurde eine maximale Masse an 5 pg Endotoxin/µg Protein für weitere Versuche toleriert.

3.3.7 SDS-PAGE

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein Verfahren zur Auftrennung eines Proteingemisches gemäß dem Molekulargewicht der enthaltenen Proteine über ein elektrisches Feld [261]. Das Gel besteht aus einem Sammelgel, welches dazu dient, die Proteine horizontal zu konzentrieren, und einem Trenngel, in welchem die denaturierten Proteine in Abhängigkeit ihres Gewichtes getrennt werden. Für das Sammelgel wurde eine Polymerdichte von 4% verwendet, für das Trenngel hingegen eine Dichte von 10% oder 12%, je nach erwartetem Molekulargewicht des gesuchten Proteins. Die genaue Zusammensetzung ist in Tabelle 1 beschrieben. Vor der Auftrennung im Gel wurden etwa 50-100 µg Protein in 1x SDS-PAGE Probenpuffer für 10 min auf 95°C erhitzt und schließlich in die Geltaschen geladen. Die Trennung fand in einer vertikalen Gelkammer bei einer Spannung von 80-130 V statt.

Tabelle 1: Zusammensetzung der SDS-PAGE Gele. Die beschriebenen Volumina der einzelnen Komponenten beziehen sich auf das Gießen von insgesamt zehn Minigelen der Fläche 10cmx8cm.

Sammelgel	4 %	Trenngel	10%	12%
Sammelgelpuffer	15 ml	Trenngelpuffer	20 ml	20 ml
Rotiphorese 40 (29:1)	6 ml	Rotiphorese 40 (29:1)	20 ml	24 ml
ddH ₂ O	45 ml	ddH ₂ O	40 ml	36 ml
TEMED	60 µl	TEMED	80 µl	80 µl
10% APS (in ddH ₂ O)	600 µl	10% APS (in ddH ₂ O)	800 µl	800 µl

3.3.8 Western Blot

Nach der Größenaufftrennung mittels SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert, welche zuvor für 10 s mit Methanol aktiviert wurde. Für den Transfer wurde eine Kammer für Semi-Dry Blotting und ein diskontinuierliches Puffersystem verwendet (**Abbildung 12**). Das Blotting wurde für 1 h durchgeführt, wobei eine Stromstärke von 1,3 mA/cm² Membran angelegt wurde [262]. Nach dem Transfer wurde die Membran kurz in PBS (pH=7,1) gelegt, um den restlichen Puffer abzuwaschen und anschließend mit 10% (w/v) Milchpulver in TBST-Puffer oder 1x Roti-Block-Lösung oder Odyssey-Blocklösung für 1 h bei Raumtemperatur geblockt. Danach folgte die Inkubation mit dem spezifischen Primärantikörper, verdünnt in der jeweiligen Blocklösung, für 3 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Die Membran wurde dreimal für 5 min in TBST gewaschen und schließlich mit Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppeltem oder IRDye-gekoppeltem (LI-Cor) Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Im letzten Waschschrift wurde ungebundener Sekundärantikörper durch viermaliges Waschen für 15 min mit TBST entfernt. Die Proteine wurden dann über Fluoreszenzdetektion mit dem LI-Cor Odyssey System detektiert oder mithilfe eines ECL-Substrates über Chemilumineszenzdetektion auf einem photosensitiven Röntgenfilm erfasst.

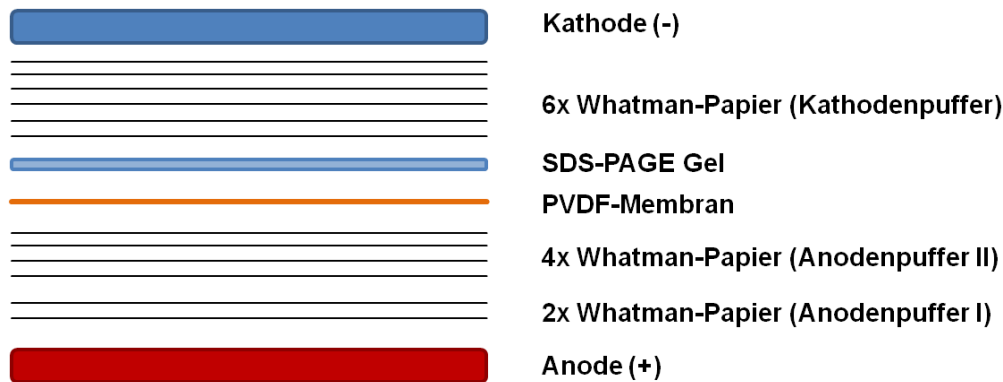


Abbildung 12: Aufbauschema eines Semi-Dry Western Blot. Zwei in Anodenpuffer I getauchte Whatman-Papiere, gefolgt von vier in Anodenpuffer II getränkten Whatman-Papieren, wurden auf die Anode der Kammer gelegt. Darauf wurde die in Methanol aktivierte PVDF-Membran und das SDS-PAGE Gel gelegt. Zwischen der Kathode und dem Gel wurden nochmals 6x Whatman-Papiere in Kathodenpuffer gelegt.

3.3.9 Indirekte Immunfluoreszenz (IF)

Um die intrazelluläre Anwesenheit von Proteinen oder deren Migration durch Hautschichten (siehe 3.1.4) analysieren zu können, wurde die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie mithilfe von Fluorochrom-konjugierten Antikörpern angewandt. Für einen *in-vitro*-Ansatz wurden dazu Zellen in 12-Well-Platten auf Deckgläschen ausgelegt und behandelt. Die Zellen wurden daraufhin dreimal mit PBS gewaschen und mit 3,7% Formaldehyd in PBS für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Die Fixierlösung wurde abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Um die Zellen zu permeabilisieren, wurden sie für 10 min mit 0,5% Triton X-100 in PBS inkubiert und nochmals dreimal in PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungen von Antikörpern möglichst gering zu halten, wurde mit 1% (w/v) BSA in PBS für 1 h bei Raumtemperatur geblockt. Die Zellen wurden mit dem Primärantikörper, verdünnt in Blocklösung, für 1 h bei Raumtemperatur in einer gesättigten Feuchtkammer inkubiert und anschließend dreimal für 5 min mit TBST gewaschen. Der in Blocklösung verdünnte, Fluorophor-konjugierte Sekundärantikörper wurde ebenfalls für 1 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss in einer Feuchtkammer auf die Zellen gegeben. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit DAPI und die Aktinfilamente, falls angegeben, mit TRITC-Phalloidin gefärbt. Die Deckgläschen mit den gefärbten Zellen wurden zum Abschluss auf Objektträger gelegt und mit verfestigendem Mowiol immobilisiert.

3.3.10 Sucrose-Dichte-Gradienten-Zentrifugation

Zur Untersuchung der Bindung zwischen mSA_preS1/2 und den Trägercapsiden und um die Partikelformation von *in vitro* assemblierten TLMcapsiden und selbstassemblierenden Δ TLMcapsiden zu analysieren, wurde eine Sucrose-Dichte-Gradienten-Zentrifugation durchgeführt. Dazu wurde 1 ml einer Probe mit mSA_preS1/2 alleine, ungeladenen

TLMcapsiden oder ungeladenen Δ TLMcapsiden oder aber mSA_preS1/2 gebunden an die Trägercapside auf einen Sucrosegradienten geladen. Der Gradient wurde von unten nach oben mit 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% und 10% (w/v) Sucrose in PBS zu je einem Volumen von 1 ml geschichtet. Die Zentrifugationsröhrchen wurden mindestens 6 h bei 4°C, 41.000 rpm in einem SW41 Ti Rotor von Beckman Coulter zentrifugiert. Nach Ablauf des Zentrifugationsschrittes wurden insgesamt 9 Fraktionen von je 1 ml von oben nach unten gesammelt und per Western Blot (siehe 3.3.8) analysiert.

3.3.11 Refraktometrie

Um sicherzugehen, dass die einzelnen Dichtephases des Sucrosegradienten während des Gießens, der Zentrifugation und der Abnahme der Fraktionen stabil geblieben waren, wurde die Dichte der Fraktionen indirekt über den Brechungsindex mithilfe eines Refraktometers erfasst. Dabei strahlt Licht zunächst durch ein bekanntes Messprisma und anschließend durch die zu untersuchende Probe. Durch die unterschiedlichen Materialeigenschaften ändert sich die Ausbreitungsrichtung des Lichtes durch eine Verschiebung der Phasengeschwindigkeit des Lichtes, während es die zwei verschiedenen Medien durchläuft. Diese Refraktion kann gemessen werden und über den Brechungsindex anhand von Tabellen auf die Dichte der Sucrose geschlossen werden. Da der gemessene Brechungsindex stark temperaturabhängig ist, wurden alle Proben bei 20°C gemessen.

3.3.12 Dialyse

Für einen Austausch des Puffersystems wurden Dialysemembranen von Spectra/por mit einem Cut-off bezüglich des Molekulargewichts von 10 kDa oder 12-14 kDa verwendet. Für die Rückfaltung von mSA_preS1/2 nach denaturierender Reinigung konnte alternativ zur Rückfaltung auf der Säule auch die Dialyse verwendet werden. Dazu wurde eine schrittweise Dialyse verwendet, bei der 6 M Urea in PBS mit 3 M Urea, 1,5 M Urea und schließlich von PBS ersetzt wurde. Jede Stufe wurde mindestens 8 h bei 4°C gerührt. Die dialysierte Probe wurde anschließend auf ihre Konzentration getestet und per SDS-PAGE analysiert.

3.3.13 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Zur Kontrolle auf Reinheit und korrekter Assemblierung der Capside wurde die Transmissionselektronenmikroskopie verwendet. Dazu wurde eine Negativkontrastierung der Proben durchgeführt: 15 μ l der Proben wurden auf Karbon-gecoatete, durch Beglimmen entladene Formvar Grids pipettiert und für 5 min bei Raumtemperatur immobilisiert. Die Grids wurden zweimal mit 25 μ l ddH₂O gewaschen und schließlich mit 10 μ l 2% Uranylacetat in ddH₂O oder 2% Wolframatophosphorsäure in ddH₂O für 10 s bei Raumtemperatur

inkubiert. Die Grids wurden anschließend getrocknet und per TEM (EM 109 von Zeiss) analysiert.

3.3.14 Sterilfiltration

Für die Sterilfiltration von Proben wurden diese mit Rotilabo- oder Millex-GV-Filtern der Porengröße 0,22 µm filtriert.

3.3.15 Aufkonzentrierung von Proben

Zum Einstellen auf die gewünschte Konzentration oder Verringern des Volumens einer Probe, wurden Amicon ultra Zentrifugenfilter verwendet, welche einen MW cut-off von 10.000 Da besitzen. Die Probe wurde in die Filtereinheit pipettiert und bei 3000 rpm zentrifugiert. Die Dauer der Zentrifugation war abhängig von der gewünschten Konzentration oder Volumen.

3.3.16 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Proteinkonzentration von Proben wurde mithilfe des NanoDrop One mit einem Volumen von 2 µl bestimmt. Für die Messung wurden folgende Molekulargewichte und Extinktionskoeffizienten verwendet:

Tabelle 2: Bestimmung der Proteinkonzentration. Angegeben sind jeweils das Molekulargewicht (MW) in Da, sowie der Extinktionskoeffizient ϵ der gemessenen Proteine.

	MW (Da)	ϵ
mSA_preS1/2	32.000	60055
TLMcapside	22.000	45045
ΔTLMcapside	22.000	45045

3.3.17 Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR)

Für die Analyse der Interaktion zwischen den TLMcapsiden und mSA_preS1/2 sowie für Δ TLMcapside und mSA_preS1/2 wurden die kinetischen Bindungsparameter mithilfe der Oberflächenplasmonresonanz (SPR) Spektroskopie mit dem Biacore T200 bestimmt. Es wurden die Bindungseigenschaften zwischen dem Strep-tagIII auf der Oberfläche der TLMcapside/ Δ TLMcapside und dem monomeren Streptavidin von mSA_preS1/2 untersucht. Dafür wurden TLMcapside und Δ TLMcapside durch kovalente Bindung auf verschiedenen Durchflusszellen (Flow cells, FC) (FC-2: Δ TLMcapside; FC-4: TLMcapside) auf einem CM5-

Chip durch Verwendung von sulfo-NHS und EDC immobilisiert. Danach wurden die übrigen reaktiven Ester chemisch durch Zugabe von Ethanolamin deaktiviert. Als Referenz dienten die Durchflusszellen FC-1 und FC-3, welche mittels sulfo-NHS/EDC aktiviert und durch Ethanolamin deaktiviert wurden, ohne dass eine Immobilisierung von Proteinen stattfand. So konnten diese Zellen als Referenzzellen für eine Hintergrundsignalkorrektur verwendet werden. Für die Errechnung der Dissoziationskonstante (K_D) in einem *Multi-Cycle* Experiment wurde eine Verdünnungsreihe von 7500 nM – 12 nM mSA_preS1/2 mit einer Flussrate von 30 µl/min in PBS, pH=7,1, 0,05% Tween20 und 3 mM EDTA auf den Chip injiziert. Da im Laufe des Experiments keine geeigneten Regenerationsbedingungen gefunden werden konnten, welche die immobilisierten Proteine nicht denaturieren würden, wurde eine Dissoziationszeit von 600 s angewandt. Als mathematisches Modell wurde das 1:1 Bindungsmodell verwendet, da es die Bindung zwischen einem Molekül monomerem Streptavidin zu einem Molekül Strep-tagIII beschreibt. Die Auswertung erfolgte durch die Software Biacore T200 control und Biacore T200 evaluation.

3.3.18 Mikrotomie

Um die Leberproben für die *in vivo* Distributionsversuche und die behandelten Hautstücke für die *ex vivo* Hautmigrationsexperimente (siehe 3.1.4) untersuchen zu können, wurden diese mithilfe der Mikrotomie in dünne Scheiben geschnitten, um sie nachfolgend einfärben und mikroskopisch analysieren zu können. Die Probe wurde dazu in einem Mikrotomkryostat bei -70°C in OCT-Lösung (*optimal cutting temperature compound*) eingebettet und in 7 µm bzw. 10 µm dicke Scheiben geschnitten. Die Schnitte wurden daraufhin auf mit Gelatine bedeckte Objektträger gelegt und nach 3.3.9 gefärbt.

3.3.19 Protein-labeling mit sulfo-NHS-Cy7

Für die Darstellung der Biodistribution von Proteinen im lebendigen Tier mittels *in vivo*-Imaging mussten die Proteine für die Fluoreszenzanalyse sichtbar gemacht werden. Dies wurde durch Konjugieren von Cy7 an die Proben erreicht. Da Mäuse vor allem durch die von ihnen aufgenommene Nahrung starke Autofluoreszenz in Bildgebungsverfahren zeigen, wurde im Rahmen der *in vivo*-Imaging Experimente entschieden, ein Fluorophor im nahen Infrarotbereich zu verwenden, da in diesem Bereich die Autofluoreszenz vernachlässigbar klein ist. Die Menge an sulfo-NHS-Cy7, welche für das *Labeln* an mSA_preS1/2, TLMcapside, ΔTLMcapside oder Ovalbumin notwendig war, wurde mit folgender Gleichung errechnet:

$$m_{\text{Cy7}} = 8 \cdot m_{\text{protein}} \cdot \frac{M_{\text{Cy7}}}{M_{\text{protein}}}$$

Zu 1 ml der Proteinlösung wurden 50 µl eines 20x Boratpuffers (pH=8,5) hinzugegeben, bevor die errechnete Menge an Cy7, gelöst in DMSO, zu den Proteinen gegeben wurde. Die Mischung aus Cy7 und Proteinen wurde für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Um das ungebundene, überschüssige Cy7 zu entfernen, wurde die inkubierte Probe mithilfe einer 5 ml Hitrap Desalting Säule aufgetrennt (siehe 3.3.4.3), sodass eine Fraktion mit Cy7-markiertem Protein und einer Fraktion mit Protein-freiem Cy7 vorlag. Die Fraktion mit Cy7-markiertem Protein wurde weiterhin bezüglich ihres Markierungsgrads (*degree of labeling*; DOL) analysiert.

$$\text{DOL} = \frac{A_{750,\text{dye}} / \epsilon_{\text{dye}}}{A_{280,\text{protein}} / \epsilon_{\text{protein}}}$$

Alle markierten Proteine, welche für das *in vivo*-Imaging verwendet wurden, wurden bezüglich der OD₇₈₀ angeglichen, um vergleichbare Proben und Ausgangsintensitäten zu haben.

3.4 Immunologische Methoden

3.4.1 FACS-Analyse

Zur Bestimmung der relativen Anzahl aktivierter CD8⁺ T-Zellen nach der Immunisierung von Mäusen wurden die Lymphozyten oder Splenozyten nach der Kokultivierung mit HBV-exprimierenden Hepatozyten (siehe 3.1.7) aus der Kultur genommen und für eine durchflusszytometrische Untersuchung gefärbt. Zum Stoppen der Sekretion und Ansammeln von IFN γ wurde sechs Stunden vor Ende der Kokultivierung je 5 µg/ml Brefeldin A und Monensin zugegeben. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Lymphozyten/Splenozyten zunächst mit PBS gewaschen und bei 500 g für 10 min abzentrifugiert. Anschließend wurden sie mit 50 µl anti-CD8-APC in MACS-Puffer für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln in 96-Well-Platten mit U-Boden inkubiert, um später CD8-positive Zellen für die Analyse zu markieren. Zum Waschen wurden zunächst 100 µl MACS-Puffer zugegeben und die Zellen bei 500 g für 5 min zentrifugiert. Im zweiten Waschschriff wurden 200 µl zugegeben und bei 300 g für 10 min zentrifugiert. Zur Permeabilisierung der Zellen, um daraufhin intrazelluläres IFN γ färben zu können, wurden 100 µl 0,1% Saponin in MACS-Puffer für 15 min bei 4°C im Dunkeln zugegeben und danach bei 300 g für 10 min abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit 50 µl anti-IFN γ -PE in 0,1% Saponin/MACS-Puffer für 30 min bei 4°C inkubiert. Gewaschen wurde danach mit 0,1% Saponin in MACS-Puffer anstelle des vorher verwendeten MACS-Puffers. Im zweiten Waschschriff wurde nun nochmals der MACS-Puffer ohne Saponin verwendet und die Zellen schließlich für 20 min bei 4°C mit 100 µl 3,7%

Formaldehyd fixiert. Zum Zwecke der Messung wurden die Zellen nochmals in MACS-Puffer gewaschen, abzentrifugiert und schließlich zu etwa je 100-150 µl in MACS-Puffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Gemessen und ausgewertet wurden die Proben mit dem CytoFlex von Beckman Coulter und der Software CytExpert.

Für die Bestimmung von intrazellulär verbliebenem Granzym A als reziproker Marker für eine CD8⁺ T-Zell-Aktivierung wurde der GranzymA-PE-Antikörper nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen hinzugegeben und nach anschließendem Waschen in MACS-Puffer analysiert.

Zur Bestimmung von intrazellulärem CD107a als Surrogatmarker für eine Degranulierung durch CD8⁺ T-Zellen wurden Lymphozyten von immunisierten Mäusen isoliert und zu je $1 \cdot 10^6$ Zellen/Well in eine 96-Well-Platte mit 200 µl RPMI (+10% hitzeinaktiviertes FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 1,4% HEPES-Puffer) gegeben. Die Zellen wurden mit anti-CD107a-alexa488 sowie mit oder ohne (Kontrolle) 1,5 µM mSA_preS1/2 für 1 h inkubiert. Anschließend wurden auch diese Zellen wie oben beschrieben für 6 h mit den Proteintransport-Inhibitoren Monensin und Brefeldin A behandelt und anschließend ebenfalls mit anti-CD8-APC gefärbt. Die Zellen wurden daraufhin wie beschrieben gewaschen, fixiert und durchflusszytometrisch analysiert.

3.4.2 Epitop-Kartierung

Zur Bestimmung der Epitope von mSA_preS1/2, welche von Antikörpern im Serum immunisierter Mäuse erkannt werden, wurde ein Peptidspot-Array verwendet. Dabei wurde die Sequenz von mSA_preS1/2 auf eine Zellulosemembran in Quadrupeln von 72 Peptiden mit 15 Aminosäuren in der Länge und einem Versatz von je 4 Aminosäuren immobilisiert. Die Membran wurde mit dem Odyssey Blockpuffer für 1 h bei Raumtemperatur geblockt und mit den Seren von immunisierten Mäusen nach dem zweiten *Boost* der Immunisierung für 16 h bei 4°C inkubiert. Die Seren wurden dafür 1:500 in Odyssey Blockpuffer verdünnt. Als Kontrolle diente jeweils das Serum derselben Maus, welches jedoch als Präimmunserum vor der Immunisierung genommen wurde und somit noch keinen Kontakt mit dem Vakzin oder den Kontrollen hatte. Die inkubierten Membranen wurden in TBST gewaschen und schließlich mit einem Fluorophor-konjugierten anti-Maus Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgte noch ein letzter Waschschrift mit TBST und anschließend die Detektion mit dem Fluoreszenzscanner Odyssey von LI-COR.

3.4.3 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Um die Menge an spezifischen Antikörpern gegen mSA_preS1/2 zu bestimmen und damit den Erfolg der Immunisierung von Mäusen quantifizieren zu können, wurde ein ELISA entwickelt, um diese Antikörper im Serum zu detektieren. Zunächst wurden 50 µl

mSA_preS1/2 in einer Konzentration von 10 µg/ml in Carbonat-Bicarbonat-Puffer (pH=9,0) auf dem Boden der Wells einer 96-Well-Platte für 16 h bei 4°C immobilisiert. Nach viermaligem Waschen mit 250 µl 0,05% Tween20 in PBS (pH=7,4) wurde die Oberfläche der Wells mit 100 µl 10% FCS in PBS für 1 h bei Raumtemperatur geblockt. Die Seren der immunisierten Mäuse wurden 1:1000 in 10% FCS in PBS verdünnt und zu je 50 µl für 2 h bei Raumtemperatur auf den Boden der Wells gegeben. Die Wells wurden daraufhin nochmals viermal gewaschen und anschließend wurde ein HRP-konjugierter anti-Maus-IgG Antikörper zugegeben. Dieser Detektionsantikörper wurde zuvor 1:1000 in 10% FCS in PBS verdünnt und in einem Volumen von 50 µl für 1 h bei Raumtemperatur in den Wells inkubiert. Nach einem letzten viermaligen Waschen wurden 50 µl Tetramethylbenzidin (TMB) hinzugegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Blaufärbung bei positivem Signal der Proben wurde durch Zugabe von 1 N H₂SO₄ gestoppt und die Signale bei einer Wellenlänge von 450 nm detektiert.

Neben dem selbst entwickelten ELISA für die Detektion mSA_preS1/2-spezifischer Antikörper im Serum immunisierter Mäuse wurden zudem zwei kommerzielle ELISA Kits verwendet: Zum einen der Enzygnost HBsAg 6.0 ELISA von Siemens für die Detektion von HBsAg und das Monitoren der *in-vitro*-Infektion (siehe 3.1.5 und 3.1.6). Zum anderen ein IFN γ -ELISA von Invitrogen zur Detektion von sekretiertem, extrazellulärem IFN γ im Überstand der EC-TC-Co-Kultur im Zuge der Zytotoxizitätsanalyse (siehe 3.1.7).

3.5 *In vivo* Experimente

3.5.1 *In vivo*-Imaging

Zum Zwecke der Analyse der Biodistribution des Vakzins und der Kontrollen im lebenden Tier wurden alle Proben mit sulfo-NHS-Cy7 markiert (siehe 3.3.19). Die markierten Proteine wurden über intraperitoneale Injektion in weiße BALB/c Mäuse injiziert (10 µg Protein pro Tier). Um die zeitabhängige Verteilung und Stabilität des Signals zu ermitteln, wurden die Mäuse bei einer Wellenlänge von 745 nm/800 nm über 1 s pro Messung mit dem *in vivo* Imager IVIS Imaging System 200 von Caliper Life Sciences analysiert. Über die Dauer des Messvorgangs wurden die Tiere über Mundstücke mit Isofluran anästhesiert. Zur Kontrolle wurde der Blankwert aller Mäuse vor der Injektion bestimmt, mit welchem Autofluoreszenz und Hintergrundsignale ausgeschlossen werden konnten. Nach Injektion der markierten Proteine wurden die Zeitpunkte 0 min, 5 min, 10 min, 30 min, 1 h, 2,5 h, 4 h und 6 h erfasst.

3.5.2 Immunisierung von Mäusen

Für sämtliche *in vivo* und *ex vivo* Experimente, außer *in vivo*-Imaging, wurden C57BL/6N Mäuse verwendet. Die Haltung der Tiere wurde unter Pathogen-freien Bedingungen

durchgeführt. Die Mäuse wurden in einem Ablaufplan von zwei *Booster*-Injektionen immunisiert – mit jeweils zehn Tagen Pause zwischen *Prime* und 1. *Boost* sowie zwischen 1. *Boost* und 2. *Boost*. Jeweils zehn Tage nach Injektion wurde den Tieren durch Punktion des retrobulbären Venenplexus, mithilfe von sterilen Glaspipetten, Blut zum Zwecke der Überwachung der Immunantwort abgenommen (siehe 3.5.3). Nach der letzten Injektion wurden die Tiere für 21 Tage in der Haltung belassen und anschließend zur Organ- und Blutentnahme durch zervikale Dislokation abgebaut.

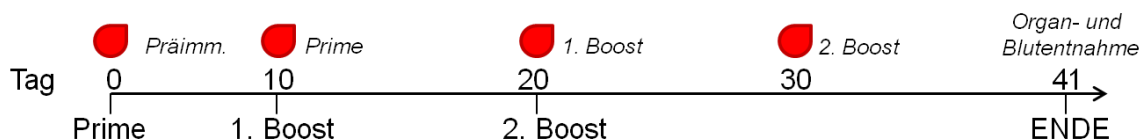


Abbildung 13: Ablauf der Immunisierung. Die Versuchstiere bekamen drei Dosen des Vakzins oder der Kontrollen im Abstand von 10 Tagen (*Prime*, 1. *Boost*, 2. *Boost*). Zehn Tage nach jeder Injektion wurde den Tieren Blut abgenommen. Vor der Initialinjektion (*Prime*) wurde das Präimmunserum genommen. 21 Tage nach dem letzten *Boost* wurden die Tiere abgebaut und die Organe sowie nochmals Blut entnommen.

Als Modellroute zur Charakterisierung der humoralen und zellulären Immunantwort wurde die intraperitoneale Injektion, mit einem maximalen Injektionsvolumen von 100 µl über Diabetesspritzen, gewählt. Zusätzlich wurden die oral-mukosale und transdermale Route als alternative Vakzinierungsansätze getestet. Bei der oral-mukosalen Immunisierung wurde den sedierten Tieren 15 µl des Vakzins oder der Kontrollen direkt in den Mund pipettiert. Bei der transdermalen Immunisierung wurde das untere Rückenfell abrasiert und 20 µl der Proben über ein Pflastersystem appliziert (**Abbildung 11** und **Abbildung 14**). Bei jedem der drei Routen wurden 10 µg TLMcapside oder ΔTLMcapside oder 2,5 µg mSA_preS1/2 in PBS oder dieselben Mengen der Proteine als gekoppelter Ansatz verabreicht. Als Kontrolle wurde je einer Gruppe im selben Ablaufplan ausschließlich PBS injiziert.

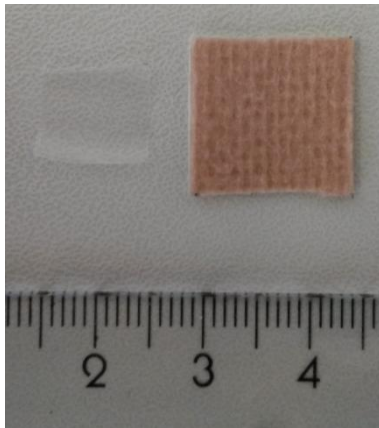


Abbildung 14: Transdermales Pflastersystem. Zur transdermalen Immunisierung wurden 20 µl der Proben auf die rasierte Haut der Mäuse gegeben und anschließend mit einer 1 x 1 cm Pflastermembran (*Backing*; links) bedeckt. Zur Fixierung der Probe und Membran auf der Haut, wurde beides mit einem 1,5 x 1,5 cm Schutzpflaster (*Tape*; rechts) überklebt.

3.5.3 Blutentnahme und Serumaufbereitung

Über die Punktion des retrobulbären Venenplexus mit Glaspipetten, welche zuvor mit UV-Licht sterilisiert wurden, wurde pro Maus und Abnahme etwa 50 – 70 µl Blut entnommen. Das Blut wurde in Microtainer überführt und bei 8000 g für 15 min zentrifugiert. Dabei wird das Serum durch ein Separationsgel im Inneren von den restlichen Blutbestandteilen getrennt. Das Serum in der oberen Phase wurde abgenommen und bei -80°C gelagert.

3.5.4 Entnahme von Lymphknoten, Milz und Haut

Um die Lymphknoten und die Milz von Mäusen zu entnehmen, wurden die Tiere zunächst durch Zugabe von CO₂ sediert und durch weitere Exposition getötet. Die Mäuse wurden an den Extremitäten auf einen Styroporblock fixiert und mit 70% Ethanol begossen, um Kontaminationen und der Verteilung von Fell in der operativen Öffnung vorzubeugen. Mit einem Skalpell wurde die Haut am Abdomen geöffnet und seitlich auseinander gespreizt und ebenfalls fixiert. Danach wurde die Bauchdecke geöffnet und im Falle einer Splenektomie die Milz herausgeschnitten. Mit einem Skalpell wurde die Milz in kleinere Stücke zerschnitten und in RPMI 1640 Medium gelegt. Sollten die Lymphknoten entnommen werden, so wurde der Körper der Maus auf dieselbe Weise geöffnet. Verwendet wurden die axillären, Subilium-, lumbal-aortischen, lateral-iliakalen, Kolik- und kaudal-mesenterischen Lymphknoten [263]. Die Lymphknoten wurden unbeschadet in RPMI 1640 Medium in eine Petrischale gelegt, um sie vor Austrocknung zu schützen. Daraufhin wurden Splenozyten und Lymphozyten aus dem Gewebe isoliert (siehe 3.1.3). Zur Entnahme der Haut wurde die Maus getötet und der Rücken anschließend vorsichtig und soweit möglich rasiert, um die Proben später einfacher auftragen zu können. Mit einem Skalpell wurde die Haut vom

Nackenansatz bis zum Schwanz in der Breite der beiden Schultergelenke als ganzes Stück entfernt. Die Haut wurde in RPMI 1640 Medium gelegt, um einer Trocknung vorzubeugen, und anschließend in passender Größe für den *ex vivo* Hautmigrationsansatz (siehe 3.1.4) zugeschnitten.

4 Ergebnisse

4.1 Produktion von mSA_preS1/2 als Antigen und zellpermeablen HBVcapsiden als Träger

4.1.1 Konstruktion von mSA_preS1/2

Als Antigen, gegen welches die Immunantwort im Falle einer HBV-Infektion gerichtet sein sollte, bietet sich das Oberflächenprotein HBsAg an [161,160,162]. Da innerhalb der PreS1-Region die Rezeptorbindedomäne des Virus für den Eintritt in die Zelle während einer Infektion lokalisiert ist [44] und PreS1 und PreS2 zudem MHC-I-restringierte Peptide zur Induktion einer CD8⁺ T-Zellantwort aufweisen [264,265], wurde PreS1PreS2 als Antigen gewählt. Um die Löslichkeit des Antigens während der Produktion zu erhöhen, wurde auf das S-Protein, welches mehrere Transmembranregionen beinhaltet [31], verzichtet. Die Kopplung des Antigens an das Trägercapsid wird über eine Bindung von monomerem Streptavidin (mSA) an einen Strep-tagIII im Spike der TLM- bzw. ΔTLMcapside vermittelt. Aus diesem Grund wurde mSA zusammen mit PreS1 und PreS2 des Genotyps D als Fusionsprotein produziert. Zum Zwecke der Proteinreinigung mittels Affinitätschromatografie wurde zusätzlich ein N-terminaler 6xHis-tag verwendet. Basierend auf dem Vektor pRSET-mSA-EGFP, welcher bereits einen N-terminalen 6xHis-tag sowie die Sequenz für mSA trägt, wurde die EGFP-Sequenz durch die von PreS1PreS2 ersetzt und das Konstrukt als pRSET-mSA-PreS1-PreS2 bezeichnet (**Abbildung 15**). Nach Transformation des Plasmids pRSET-mSA-PreS1-PreS2 in kompetente *E. coli* BL21 (DE3) konnte das Fusionsprotein mSA_preS1/2 produziert werden.

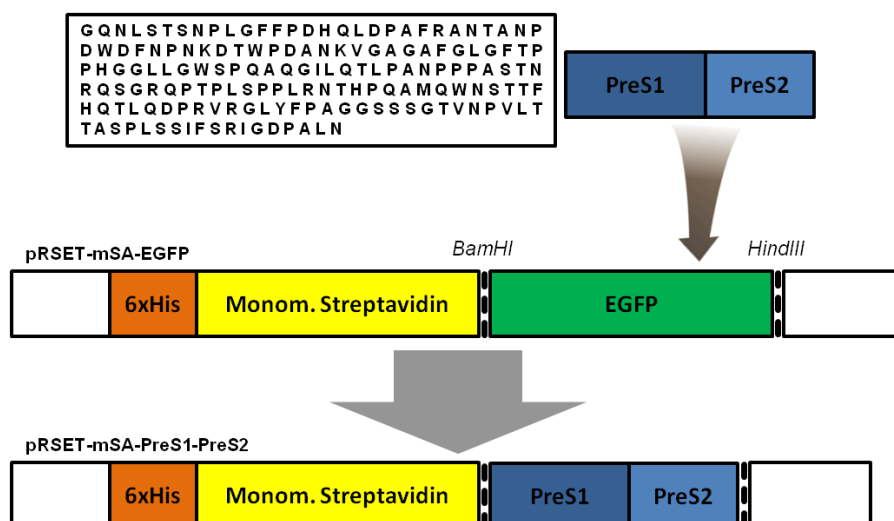


Abbildung 15: Konstruktion des Vektors pRSET-mSA-PreS1-PreS2. Schematische Darstellung des Antigenkonstrukts kodierend für monomeres Streptavidin und PreS1PreS2 als Fusionsprotein. Durch den

Austausch von EGFP durch PreS1PreS2 des Plasmids pRSET-mSA-EGFP wurde pRSET-mSA-PreS1-PreS2 erzeugt. mSA dient als Adapterprotein für die Kopplung an Strep-tagIII-fusionierte Trägerpartikel und der 6xHis-tag der Proteinreinigung mittels Affinitätschromatografie.

4.1.2 Reinigung von mSA_preS1/2

Zum Zwecke der Reinigung von in *E. coli* produziertem mSA_preS1/2 wurde der 6xHis-tag am N-Terminus des Fusionsproteins und eine Ni-NTA-Affinitätschromatografie genutzt. Dabei wird die Bindung von Histidin an Ni^{2+} -Chelaten in Nitrilotriessigsäure (NTA) immobilisiert an einer Agarose-Säule ausgenutzt. Da sich das rekombinante Protein während der Produktion in Form von *Inclusion bodies* in den Bakterienzellen ansammelt, musste diese unlösliche Fraktion zunächst resolubilisiert und anschließend zurückgefaltet werden. Dazu wurden die Bakterien zunächst abzentrifugiert und die *Inclusion bodies* nach einer Lyse der Bakterien schließlich mittels Harnstoff-haltigem Puffer mehrfach gewaschen (siehe 3.3.3). Die Pellets wurden daraufhin mithilfe eines Guanidinhydrochlorid-Puffers unter denaturierenden Bedingungen resolubilisiert und über eine 5 ml Ni-NTA-Säule gegeben. Durch langsamen Austausch des denaturierenden Puffers mit PBS (pH=7,2) wurde das an der Säule gebundene Protein bzw. der mSA-Anteil des Fusionsproteins in die native Konformation rückgefaltet (**Abbildung 16 a**). Durch Zugabe von Imidazol-haltigem nativem Puffer wurde das renaturierte Protein eluiert und in 500 μl Fraktionen gesammelt (**Abbildung 16 b**). Mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung sowie über Western Blot konnte die hohe Reinheit des produzierten Proteins bestätigt werden (**Abbildung 16 c**). Das theoretische Molekulargewicht von mSA_preS1/2 liegt bei etwa 34 kDa, in der SDS-PAGE bzw. im Western Blot zeigt sich allerdings ein leicht erhöhtes apparentes Molekulargewicht von 35-36 kDa.

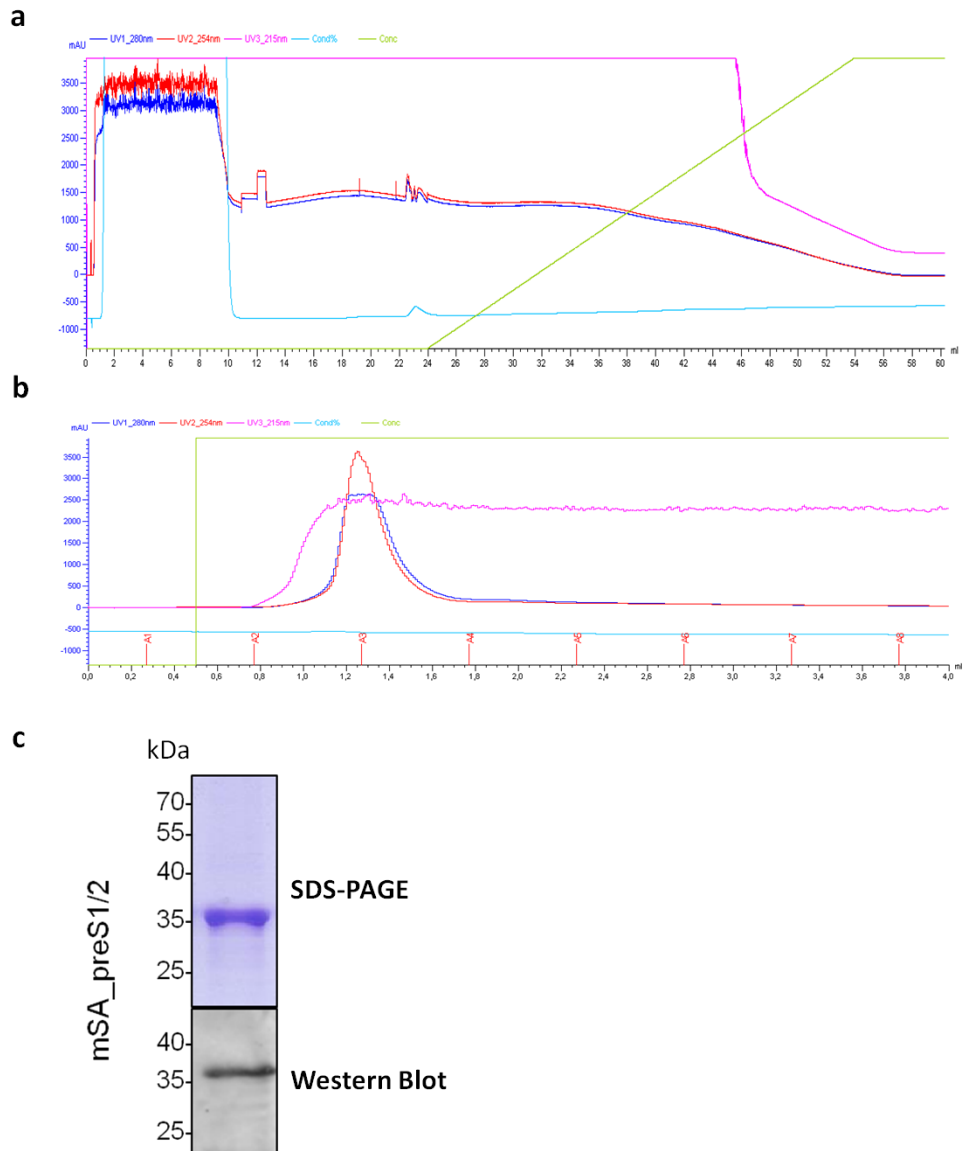


Abbildung 16: Proteinreinigung von rekombinantem mSA_preS1/2 mittels Affinitätschromatografie. Klares Proteinlysate wurde unter denaturierenden Bedingungen auf eine 5 ml Ni-NTA-Säule gegeben. **(a)** Chromatogramm der affinitätschromatografischen Aufreinigung. Im ersten Abschnitt wurde rekombinantes mSA_preS1/2 im denaturierten Zustand auf der Säule gebunden, um dieses im zweiten Abschnitt durch langsame Erhöhung des Anteils an PBS (pH=7,2) auf der Säule zu renaturieren. **(b)** Durch Zugabe von Imidazol wurde das rückgefaltete Protein unter nativen Bedingungen eluiert und in 500 µl Fraktionen gesammelt. **(c)** Das Coomassie-gefärbte SDS-PAGE-Gel sowie ein Western Blot zeigen die hohe Reinheit des produzierten Fusionsproteins.

4.1.3 Produktion und Reinigung von TLMcapsiden und ΔTLMcapsiden

Als Träger-VLPs zum Transport des mSA_preS1/2 Antigens wurden zellpermeable HBVcapside verwendet, welche 2xTLM (PDGIRSFISLP-SGS-PLSSIFSRIGDP) als

Tandempeptid am N-Terminus und ein Strep-tagIII (2x Strep-tagII: WSHPQFEK-GGGS-WSHPQFEK) im *Spike-tip* tragen. Aufgrund der zur Oberfläche orientierten Struktur der *Spikes* werden Streptavidin-Fusionsproteine, welche an den Strep-tagIII in den *Spike-tips* binden, ebenfalls auf der Oberfläche der Capside präsentiert. Die zellpermeablen VLPs werden im Folgenden als TLMcore (monomere Untereinheit) oder TLMcapside (assemblierte Partikel) bezeichnet. Als Kontrolle für die permeablen VLPs wurden Δ TLMcapside verwendet. Diese ähneln stark den TLMcapsiden, mit dem Unterschied, dass sie kein TLM und damit keine zellpermeablen Eigenschaften besitzen. Diese werden im Folgenden als Δ TLMcore (monomere Untereinheit) oder Δ TLMcapside (assemblierte Partikel) bezeichnet. Beide Konstrukte tragen einen HA-tag (Influenza Hämagglutinin) und Δ TLMcore zusätzlich einen 6xHis-tag (**Abbildung 17**). Der HA-tag erfüllt einerseits die Aufgabe eines Linkers zwischen TLM und Core AS 1-78 und kann zusätzlich zur Detektion der Proteine verwendet werden. Die Konstrukte für TLMcore und Δ TLMcore stammen beide aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe, deren Ergebnisse in [61] veröffentlicht wurden.

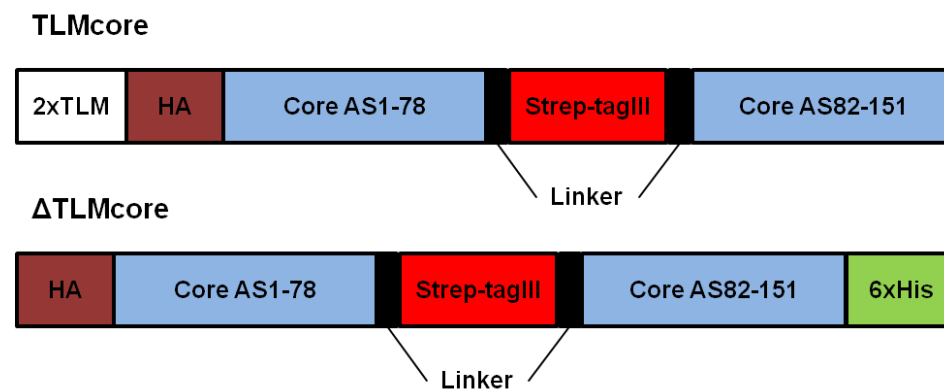


Abbildung 17: Aufbau der rekombinanten Proteine TLMcore und Δ TLMcore. Das zellpermeable TLMcore besitzt ein 2xTLM-Tandempeptid am N-Terminus sowie einen Strep-tagIII in der auf der Oberfläche des Capsids lokalisierten *Spike*-Domäne. Als Kontrolle für TLMcore diente Δ TLMcore, welches kein TLM besitzt und damit impermeabel ist. Beide Konstrukte besitzen zusätzlich einen HA-tag am N-Terminus.

Wie mSA_preS1/2 wurden die Plasmide für TLMcore und Δ TLMcore in kompetente *E. coli* BL21 (DE3) transformiert und produziert. Nach Pelletierung und enzymatischer Lyse sowie Ultraschallaufschluss der Bakterien in nativem PBS-Puffer wurde das klare Lysat auf eine 5 ml Streptactin-Säule zur Reinigung mittels Streptactin-Affinitätschromatografie gegeben. Die gebundenen Proteine wurden anschließend durch Zugabe von Desthiobiotin unter nativen Bedingungen in 1 ml Fraktionen eluiert (**Abbildung 18 a**). Da das Desthiobiotin des Elutionspuffers nach der Elution in den Proben verbleibt und eine Bindung zwischen Strep-tagIII und dem Streptavidin des zu koppelnden Antigens stören würde, wurde es im nachfolgenden Schritt entfernt. Dazu wurde die Probe auf eine 5 ml Hitrap Desalting Säule

gegeben und der Elutionspuffer mit PBS ausgetauscht (**Abbildung 18 b**). Mittels SDS-PAGE und Western Blot konnte die Reinheit der beiden Proteine ermittelt werden, welche jeweils eine Bande bei etwa 25 kDa zeigen, was ihrem theoretischen Molekulargewicht entspricht (**Abbildung 18 c**).

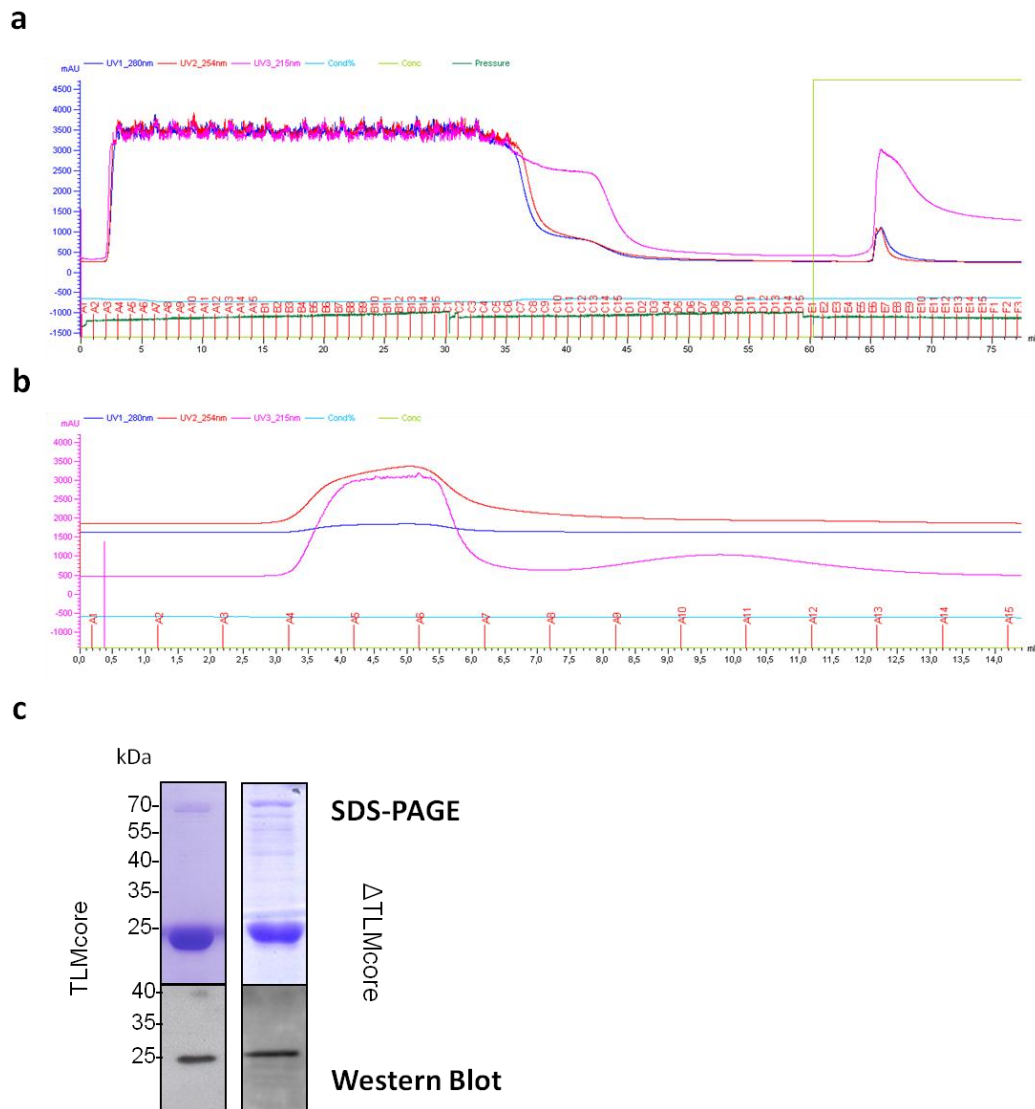


Abbildung 18: Reinigung von TLMcore und ΔTLMcore mittels Affinitätschromatografie. Proteine aus klaren Bakterienlysaten wurden zur Proteinreinigung über eine Streptactin-Säule gegeben und deren Puffer anschließend ausgetauscht. **(a)** Chromatogramm einer Streptactin-Affinitätschromatografie zur Aufreinigung der Core-Proteine. **(b)** Chromatogramm des Puffertauschs durch eine Hitrap Desalting Säule. **(c)** Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE-Gel und Western Blot zeigen die Banden von TLMcore (links) und ΔTLMcore (rechts).

Da sich TLMcore Proteine nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß von selbst zu TLMcapsiden assemblieren, wurde die Ionenstärke durch Zugabe von 400 mM NaCl im Probenpuffer erhöht. Wie mithilfe eines Transmissionselektronenmikroskop (TEM) sichtbar

gemacht wurde, bilden sich dadurch vollständig assemblierte Capside mit T=3 und T=4 Symmetrie. Neben den vollständigen Partikeln existieren allerdings auch Capside, welche nur zu einem gewissen Grad assembliert sind und Fragmente verschiedener Größe bilden. Die Δ TLMcore Proteine hingegen autoassemblieren ohne zusätzliche Zugabe von NaCl zu vollständigen Δ TLMcapsiden (**Abbildung 19**).

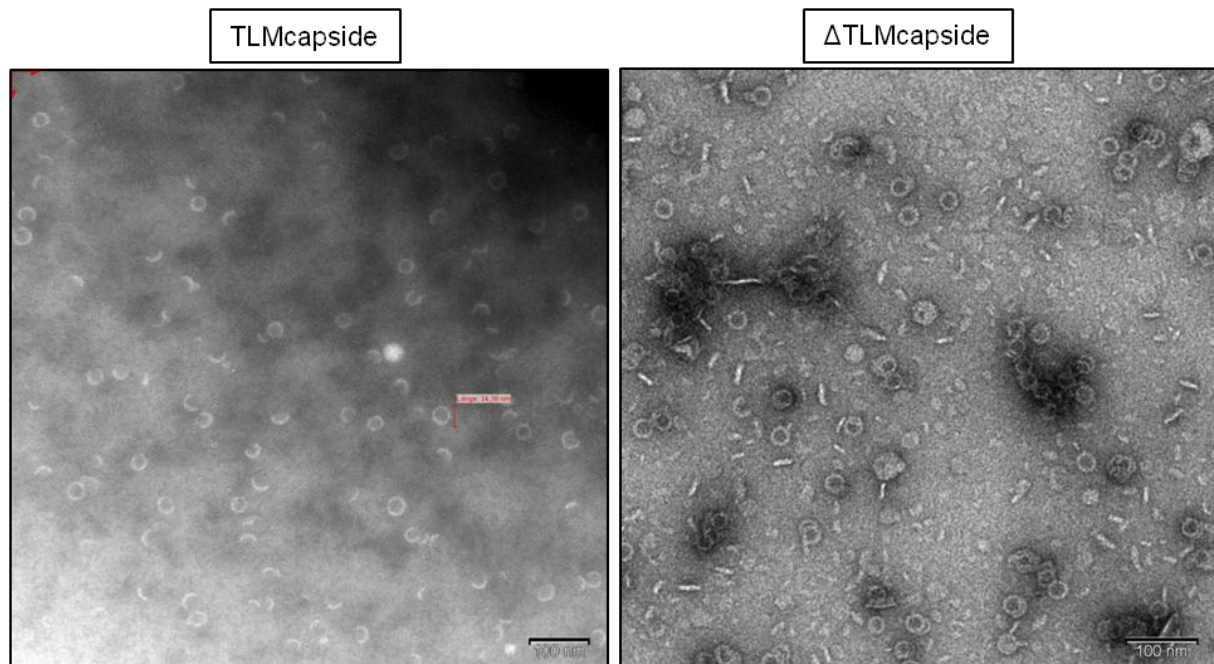


Abbildung 19: Assemblierung von TLM- und Δ TLMcapsiden. TEM-Aufnahme von assemblierten Capsiden. Während Δ TLMcore von selbst zu Δ TLMcapsiden assemblieren, führt erst die Erhöhung der Ionenstärke durch Zugabe von 400 mM NaCl dazu, dass sich TLMcore zu TLMcapsiden assemblieren. Maßstabsbalken entspricht 100 nm.

4.2 Trägercapside können mSA_preS1/2 auf ihrer Oberfläche präsentieren

Nachdem mSA_preS1/2 und TLM- sowie Δ TLMcapside erfolgreich hergestellt werden konnten, sollte im Nachfolgenden geprüft werden, ob und in welchem Maße das monomere Streptavidin des mSA_preS1/2 an den Strep-tagIII in den *Spikes* der Trägercapside bindet und das Antigen somit auf der Oberfläche der Capside präsentiert. Dazu wurden die Capside in einem Massenverhältnis von 1:4 (Capside : Antigen) mit mSA_preS1/2 über Nacht bei 4°C inkubiert und per TEM untersucht. Als Kontrolle dienten ungekoppelte TLM- und Δ TLMcapside. Dabei ist ein deutlicher Zuwachs des Durchmessers nach einer Kopplung zu erkennen, welcher für eine Bindung des Antigens an die Trägerpartikel spricht (**Abbildung**

20 a). Sowohl TLMcapside als auch Δ TLMcapside scheinen das Antigen in gleichem Maße zu binden. Zusätzlich wurden TLMcapside mit mSA_preS1/2 gekoppelt und über Sucroседichtegradientenzentrifugation in Abhängigkeit ihrer Dichte separiert. Der Gradient umfasste mehrere Schichten von 0%-80% w/v Sucrose. Als Kontrolle wurden zusätzlich TLMcapside alleine und freies mSA_preS1/2 über einen Gradienten separiert. Nach zweistündiger Separation wurden die Fraktionen von oben (0%) nach unten (80%) abgenommen und über SDS-PAGE und anschließendem Western Blot analysiert (**Abbildung 20 b**). Aufgrund der unterschiedlichen Dichte sollte mSA_preS1/2 und TLMcapside in unterschiedlichen Fraktionen wiederzufinden sein. Während freies mSA_preS1/2 in den ersten beiden Fraktionen mit sehr niedriger Dichte detektiert wird, befinden sich die ungekoppelten TLMcapside in den untersten, den dichteren Fraktionen. Allerdings sind ebenfalls Core-Signale in den weniger dichten Fraktionen zu erkennen, welche für die Anwesenheit von TLMcore-Monomeren oder -Oligomeren sprechen, welche nicht Teil vollassemblierter Capside sind. Durch die Inkubation von mSA_preS1/2 mit TLMcapsiden ist eine Verschiebung innerhalb der Fraktionen auf Seiten des mSA_preS1/2 erkennbar. Durch die Kopplung des leichten mSA_preS1/2 an die Oberfläche der schweren Capside wurden sie durch den Gradienten mitgeführt und sind nun nicht mehr nur in den weniger dichten Fraktionen vorhanden, sondern werden zusammen mit TLMcapsiden in den Fraktionen hoher Dichte detektiert.

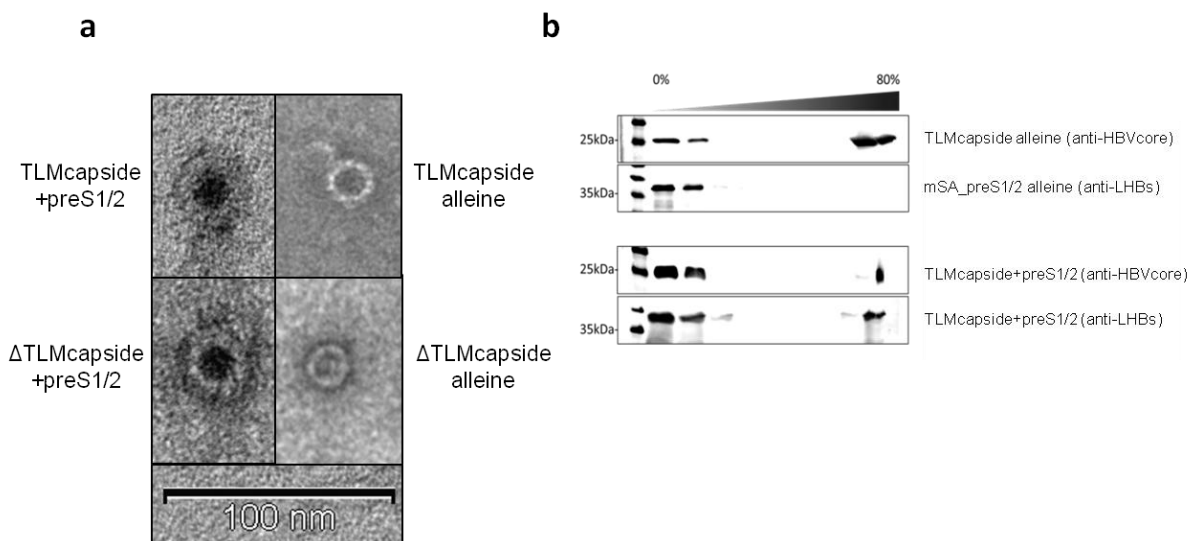


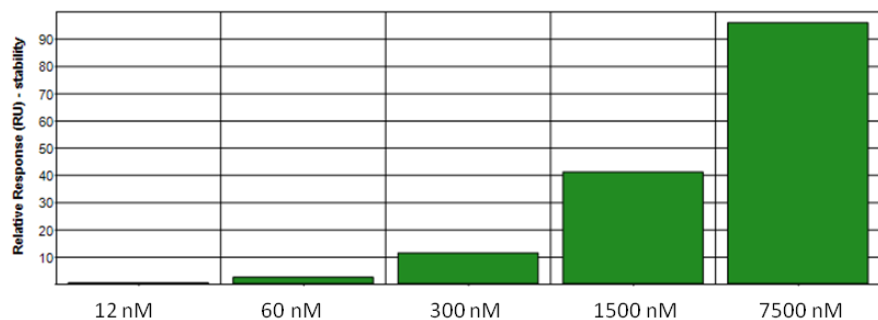
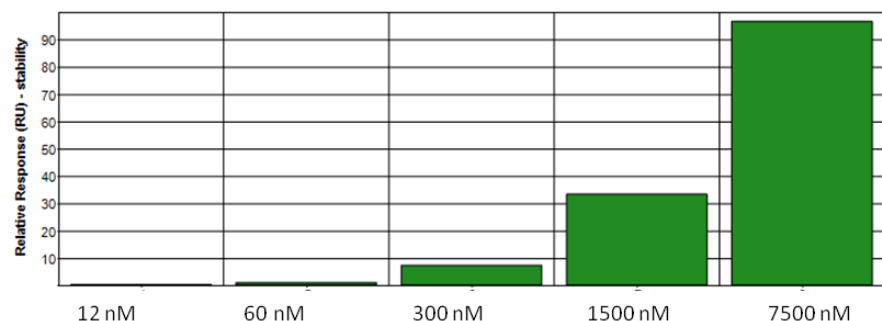
Abbildung 20: Bindung von mSA_preS1/2 an TLM- und Δ TLMcapside. Die Trägercapside wurden im Massenverhältnis 1:4 mit mSA_preS1/2 gekoppelt. (a) TEM-Aufnahme von TLM- und Δ TLMcapsiden gekoppelt mit mSA_preS1/2 (links) und ungekoppelte Capside ohne Antigen (rechts). (b) Western Blot eines Sucroседichtegradienten. Während TLMcapside in Fraktionen mit höherer Dichte detektiert werden, verbleibt mSA_preS1/2 in den oberen Schichten geringerer Dichte. Nach Kopplung von TLMcapsiden mit mSA_preS1/2 wird das Antigen vom Capsid durch den Gradienten zu den Fraktionen höherer Dichte mitgeführt.

Für eine detailliertere Analyse der Interaktion von Strep-tagIII und monomerem Streptavidin wurde die Dissoziationskonstante (K_D) für die Bindung zwischen mSA_preS1/2 und den Trägerscapsiden ermittelt. Dazu wurde die Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (*surface plasmon resonance spectroscopy*, SPR) angewandt. TLMcapside und Δ TLMcapside wurden hierzu jeweils auf verschiedenen CM5-Chips immobilisiert. Anschließend wurden verschiedene Konzentrationen an mSA_preS1/2 (7500 nM – 12 nM) über die Chips gegeben und das Antigen damit in Kontakt mit den jeweils immobilisierten Capsiden gebracht. In einer mehrzyklischen Kinetik (*multi cycle kinetic*) wurde daraufhin die K_D zwischen mSA_preS1/2 und TLMcapsiden bzw. mSA_preS1/2 und Δ TLMcapsiden ermittelt. Dabei wurde beobachtet, dass mSA_preS1/2 an beide Trägerscapside gleichermaßen konzentrationsabhängig bindet (**Abbildung 21 a**). Die Berechnung der Dissoziationskonstante ergab einen Wert von $K_D=1,6 \cdot 10^{-7}$ M zwischen Antigen und TLMcapsiden und einen Wert von $K_D=3,5 \cdot 10^{-7}$ M zwischen Antigen und Δ TLMcapsiden (**Abbildung 21 b**).

Zusammengefasst zeigen die Daten, dass Streptavidin-fusioniertes PreS1PreS2 über Strep-tagIII-Bindung an die Oberfläche von TLM- und Δ TLMcapsiden gebunden werden kann.

a

TLMcapside

 Δ TLMcapside

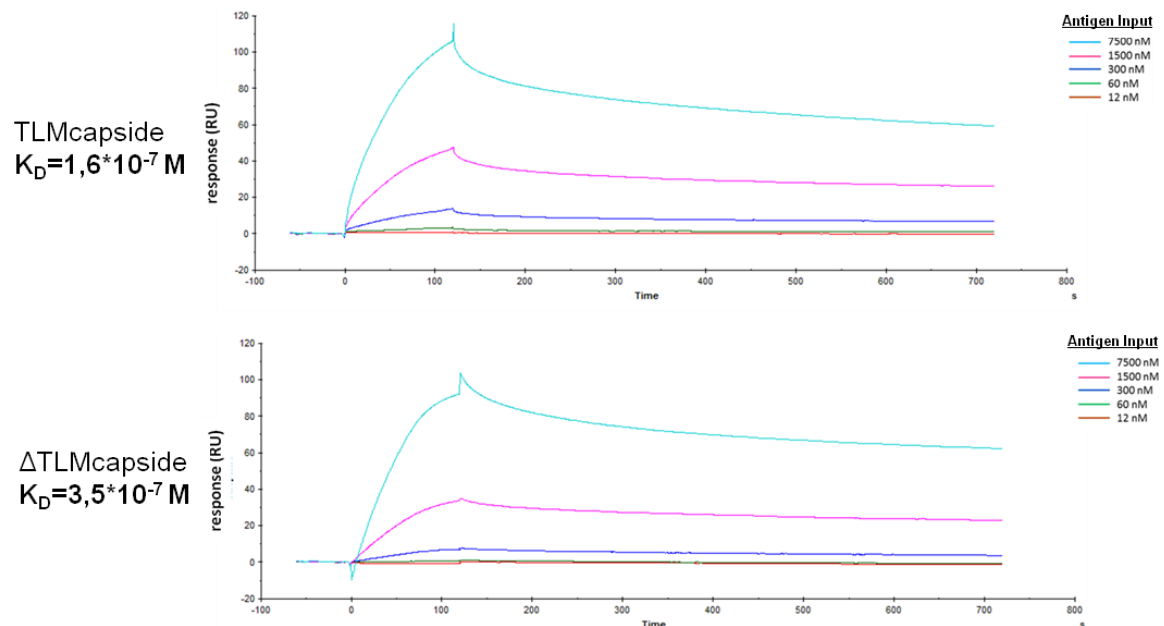
b

Abbildung 21: SPR-Analyse zur Bindung von mSA_preS1/2 an TLM- und Δ TLMcapside. Die beiden Trägerscapside wurden auf CM5-Chips immobilisiert und mit verschiedenen Konzentrationen an mSA_preS1/2 inkubiert. Mittels SPR-Spektroskopie wurde die Affinität zwischen beiden Komponenten untersucht. **(a)** Die Bindung des Antigens an die Capside ist in beiden Fällen konzentrationsabhängig. **(b)** In einer multizyklischen Kinetik wurde die Dissoziationskonstante K_D zwischen Antigen und TLMcapsiden und Antigen und Δ TLMcapsiden ermittelt.

4.3 Zellpermeable TLMcapside diffundieren durch Zellmembranen und komplette Gewebsschichten *in vitro* und *in vivo*

Nachdem untersucht worden war, ob die Trägerpartikel sowie das Antigen nach erfolgreicher Produktion miteinander gekoppelt werden können, wurde überprüft, ob die postulierten zellpermeablen Eigenschaften der TLMcapside *in vitro* und *in vivo* beobachtet werden können. Zudem wurde untersucht, ob TLMcapsid-gekoppeltes Antigen auf diesem Weg mittransportiert werden kann.

4.3.1 Beladene und unbeladene TLMcapside diffundieren ins Zytoplasma von Zellen *in vitro*

Um zu analysieren, ob mSA_preS1/2, gekoppelt an zellpermeable TLMcapside, in der Lage sind, durch die Zellmembran zu translozieren, wurde ein Zellpermeabilitäts-Assay mit HepG2

Zellen durchgeführt. Als Kontrolle für die Permeabilität der TLMcapside dienten die TLM-deletierten Δ TLMcapside gekoppelt mit mSA_preS1/2 sowie freies, ungebundenes mSA_preS1/2. Als zusätzliche Kontrolle wurden die Capside jeweils ohne gebundenes Antigen verwendet, um mögliche Effekte durch mSA_preS1/2 auf die Permeabilität zu untersuchen. Die HepG2 Zellen wurden mit dem Vakzin (TLMcapside=200 μ g/ml) sowie allen Kontrollen (Δ TLMcapside=200 μ g/ml, mSA_preS1/2=100 μ g/ml) inkubiert. Um internalisierte Proteine zu detektieren, wurden die Zellen per indirekter Immunfluoreszenzfärbung mit α -HBVcore und α -LHBs Antikörpern sowie mit DAPI und Phalloidin-633 gefärbt und mithilfe eines CLSM analysiert. Es wurde beobachtet, dass durch die Beladung von Antigenen auf TLMcapside ein effizienter Transfer von mSA_preS1/2 durch die TLMcapside ins Zytoplasma der Zellen stattfindet (**Abbildung 22**). Im Falle von Δ TLMcapsiden konnte keine intrazelluläre Färbung von Core oder transportiertem mSA_preS1/2 detektiert werden, was für ein Ausbleiben der Migration ins Zytoplasma spricht. Bei der Inkubation der Zellen mit freiem mSA_preS1/2 sind hingegen intrazelluläre Signale sichtbar. Eine geringfügige Zellpermeabilität könnte durch das Vorhandensein des TLM im PreS2 Anteil von mSA_preS1/2 erzielt werden. Wird mSA_preS1/2 jedoch an Δ TLMcapside gekoppelt, zeigt sich dieser Effekt nicht mehr. Die erhobenen Daten demonstrieren die zellpermeablen Eigenschaften der TLMcapside und ihr Vermögen, gekoppelte Antigene auf ihrer Oberfläche mit ins Zytoplasma zu transferieren. Ohne TLM zeigt sich hingegen, wie bei beladenen und unbeladenen Δ TLMcapsiden, kein intrazelluläres Signal und damit keine Diffusion durch die zelluläre Membran.

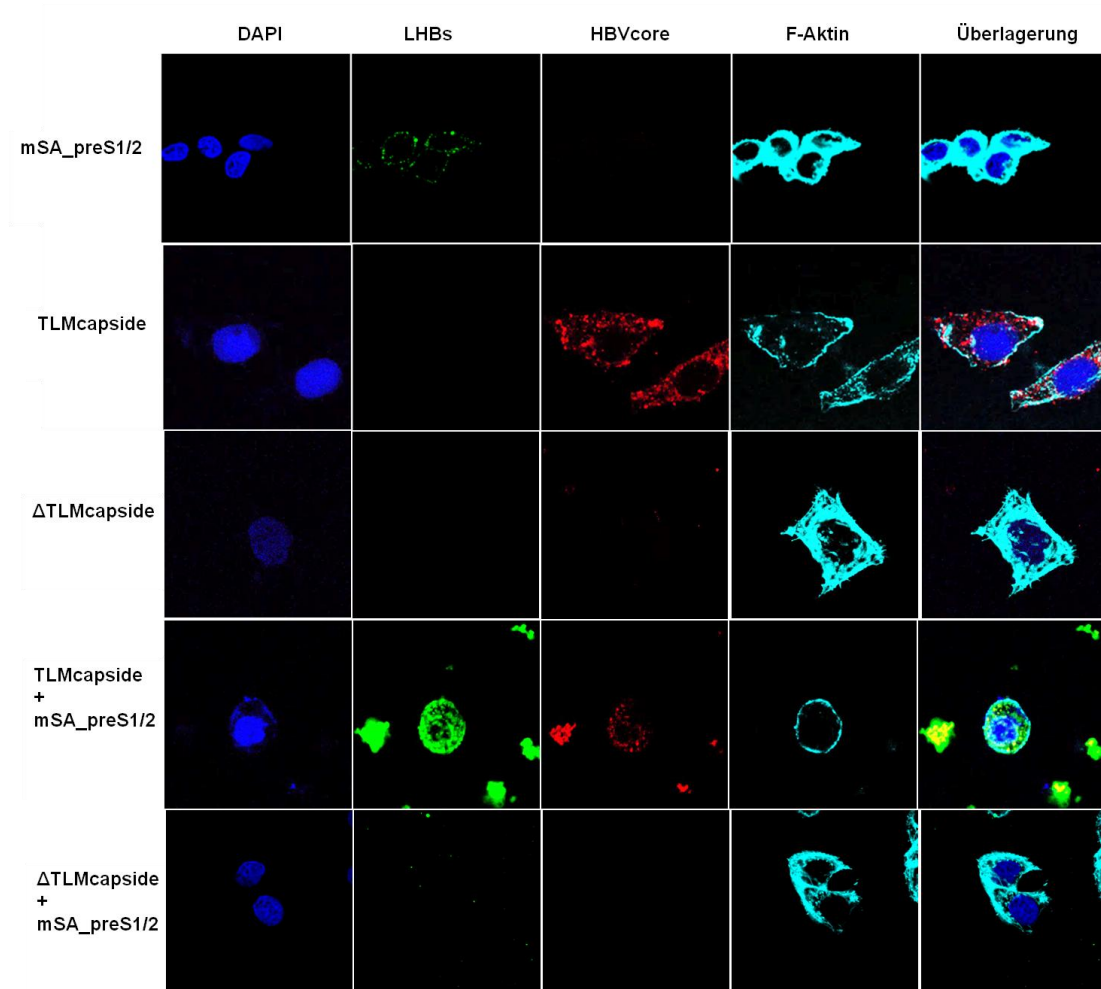


Abbildung 22: *In vitro* Zellpermeabilität von beladenen und unbeladenen TLMcapsiden. CLSM-Analyse von HepG2 Zellen inkubiert mit dem Vakzin TLMcapsids+mSA_preS1/2 (200 µg/ml) sowie mit Kontrollen (ΔTLMcapside=200 µg/ml, mSA_preS1/2=100 µg/ml) für 1 h bei 37°C. Nach Fixierung der Zellen wurden sie mit α-Core (rot) und α-LHBs (grün) spezifischen Antikörpern sowie mit DAPI (blau) und Phalloidin-633 (türkis) gefärbt. TLMcapside besitzen die Eigenschaft durch die Membran und ins Zytoplasma von Zellen zu diffundieren. Dabei können sie, beladen mit Antigen, dieses ebenfalls durch die Zellmembran transferieren. Bei fehlendem TLM (ΔTLMcapside) verlieren die Capside diese Fähigkeit und gelangen nicht durch die Membran.

4.3.2 Längere Nachweisbarkeit der Biodistribution von TLMcapsiden in Mäusen nach intraperitonealer Injektion *in vivo*

Um die Biodistribution von zellpermeablen TLMcapsiden in der physiologischen Umgebung eines lebenden Organismus zu untersuchen, wurde die Ausbreitung des Vakzins nach intraperitonealer Injektion in BALB/c Mäusen analysiert. Dazu wurden alle einzelnen Komponenten und Kontrollen mit dem Fluorochrom Cy7 markiert (siehe 3.3.19) oder, falls mSA_preS1/2 an TLM- und ΔTLMcapside gekoppelt wurde, nur mSA_preS1/2 mit Cy7 gebunden und i.p. in die Mäuse injiziert. Zu diesem Zweck wurde das fluoreszenzbasierte *in*

vivo-Imaging (IVIS) angewandt und die Mäuse mit neun Zeitpunkten in einem Zeitraum von 0 h bis 6 h nach Injektion beobachtet. Die Fluoreszenzdetektion wurde bei einer Wellenlänge von 745/800 nm gemessen. Die Analyse ergab, dass in den ersten 30 min alle einzeln applizierten Komponenten zunächst in der Umgebung des Peritoneums verbleiben. Das Antigen mSA_preS1/2 ist ohne Trägercapsid bereits nach einer Stunde nahezu im gesamten Körper systemisch verteilt. Das Signal kann für weitere 1,5 h detektiert werden, bevor es schließlich abnimmt (**Abbildung 23 a**). Unbeladene TLM- und Δ TLMcapside (10 μ g) zeigen ein ähnliches distributives Profil innerhalb der ersten Stunde. Sie können zunächst im Kopf, Peritoneum und in den Extremitäten nachgewiesen werden. Während sich das Verteilungsprofil der Δ TLMcapside ab diesem Zeitpunkt nicht mehr deutlich ändert, zeigen die TLMcapside hingegen eine andere Verteilung. Nach 2,5 h sind sie im gesamten Körper verteilt. Diese Ausbreitung hält über die Beobachtungszeit von 6 h hinaus an, ohne dass ein vermindertes Signal detektiert wird. Das Profil von Cy7, ohne Bindung an ein Protein, hebt sich hingegen deutlich von den anderen Profilen ab. Die Distribution verläuft wesentlich schneller, mit intensiveren Signalen und nimmt früher wieder ab.

Wird Cy7-gebundenes mSA_preS1/2 an unmarkierte TLM- und Δ TLMcapside gekoppelt, so unterscheidet sich das Distributionsmuster je nach verwendetem Trägercapsid (**Abbildung 23 b**). Wurde mSA_preS1/2 an TLMcapside gekoppelt, so wurde eine systemische Verteilung beobachtet, welche sich weitestgehend über den gesamten Körper des Tieres ausbreitet. Die Signalintensität nimmt von Stunde 1 bis Stunde 6 langsam ab. Wurde mSA_preS1/2 als Kontrolle an Δ TLMcapside gekoppelt, so wurde ein wesentlich schwächeres Signal detektiert. Innerhalb einer Stunde distributiert das Signal im Peritonealraum, im Kopf und den Pfoten und nimmt daraufhin wieder ab. Insgesamt wurde bei Benutzung von TLMcapsiden als Träger eine stärker ausgeprägte, systemische Verteilung detektiert als bei den impermeablen Δ TLMcapsiden. Dies spricht dafür, dass das Laden von Antigen auf TLMcapside das Verteilungsmuster beeinflusst und die systemische Ausbreitung des Antigens durch die permeablen Trägercapside gefördert wird.

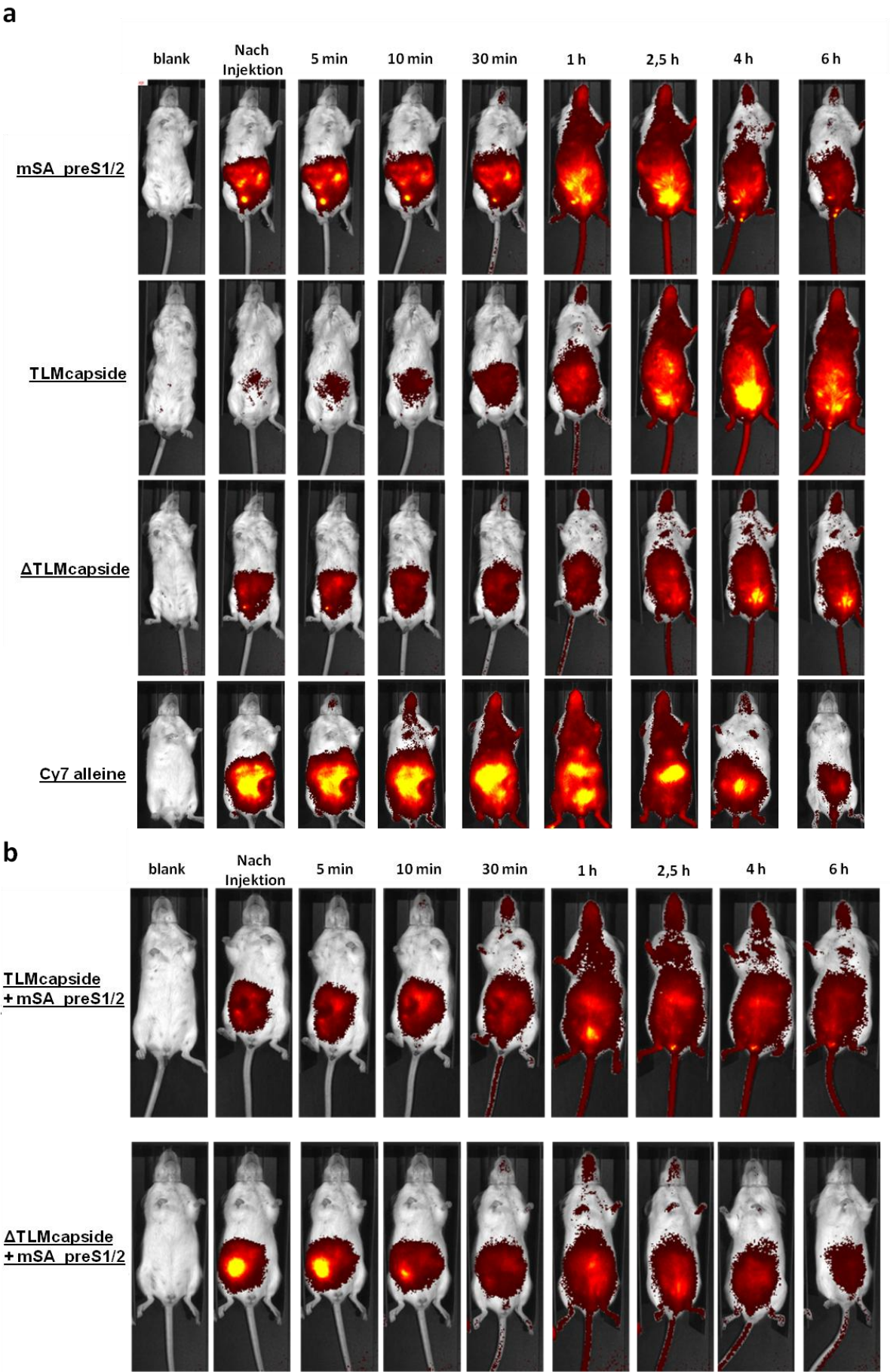


Abbildung 23: *In vivo*-Imaging zur Analyse der Biodistribution nach intraperitonealer Injektion. TLMcapside und einzelne Kontrollen (10 µg) (a) sowie mSA_preS1/2 gebunden an Capside (2,5 µg + 10 µg) (b) wurden mit Sulfo-NHS-Cy7 gekoppelt und BALB/c Mäusen intraperitoneal injiziert. Das Fluoreszenzsignal von gebundenem Cy7 wurde per fluoreszenzbasiertem *in vivo*-Imaging (IVIS) bei 745/800 nm detektiert. Die Biodistribution der Proteine wurde zu neun Zeitpunkten in einem Zeitraum von 0h bis 6h beobachtet. Die farbigen Bereiche zeigen die Anwesenheit von Cy7-markierten Proteinen in verschiedenen Intensitäten (dunkelrot = niedrige Intensität; gelb = hohe Intensität).

4.3.3 *In vivo* Distribution von beladenen TLMcapsiden in der Leber zeigt Diffusion ins Zytoplasma von Hepatozyten

Um nach der Untersuchung der Biodistribution des Vakzins und den Kontrollen im gesamten Körper der Tiere nun eine detailliertere Analyse der Leber vorzunehmen, wurde die Ausbreitung der Proteine im Innern der Lebern von Mäusen untersucht. Zu diesem Zweck wurde C57BL/6N Mäusen intraperitoneal TLMcapside+mSA_preS1/2 (10 µg), ΔTLMcapside+mSA_preS1/2 (10 µg) und, als Negativkontrolle, PBS injiziert. Nach 2,5 h wurden die Mäuse getötet und eine Hepatektomie vorgenommen. Aus den Proben der Lebern wurden Kryoschnitte gefertigt und eine immunohistochemische Untersuchung mit PreS1-spezifischen Antiseren durchgeführt. Insgesamt wurde ein etwas schwächeres PreS1-Signal detektiert, wenn den Mäusen TLMcapside statt ΔTLMcapside als Träger injiziert wurden. Das detektierte mSA_preS1/2 war in diesem Fall gleichmäßig sowohl intra- wie auch extrazellulär über die Zellen verteilt. Im Vergleich dazu wurde ein stärkeres PreS1-Signal gemessen, wenn als Träger ΔTLMcapside verwendet wurden. Durch Verwendung der impermeablen ΔTLMcapside reicherte sich mSA_preS1/2 vor allem an der Oberfläche der Zellen und vergleichsweise wenig im Zytoplasma an (**Abbildung 24**). Aufgrund der in **Abbildung 23** beobachteten systemischen Distribution der TLMcapside liegt das Vakzin zu geringeren Mengen in der Leber vor, da es sich im Körper des Tieres mehr verdünnt als die impermeablen ΔTLMcapside. Diese *in vivo* Untersuchung bestätigt außerdem die Ergebnissen zur Diffusion ins Zytoplasma des *in vitro* Permeabilitätsassays (**Abbildung 22**) und untermauert die Erkenntnisse über die zellpermeablen Eigenschaften der TLMcapside.

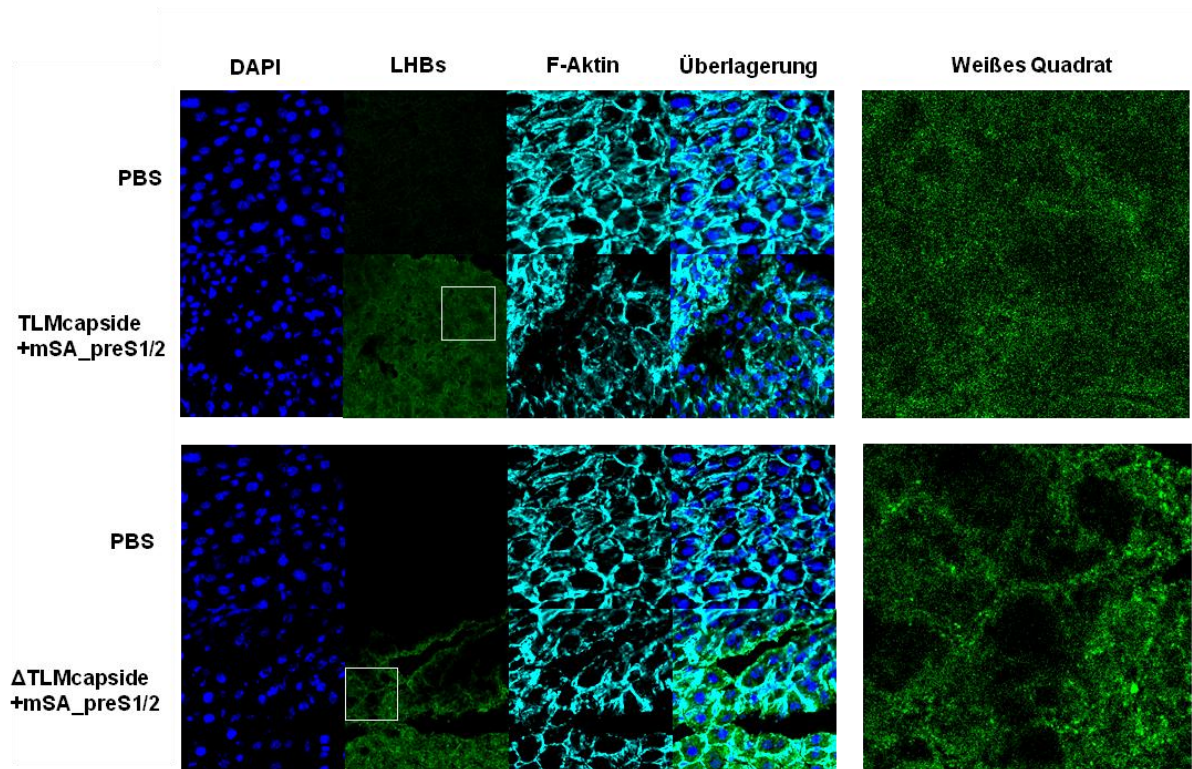


Abbildung 24: Distribution von Antigen-beladenen TLM- und Δ TLMcapsiden in der Leber. Um die intrazelluläre Verteilung von beladenen TLMcapsiden mit der von impermeablen, beladenen Δ TLMcapsiden zu vergleichen, wurden je 2,5 μ g mSA_preS1/2 an je 10 μ g Capside gekoppelt. Diese wurden C57BL/6N Mäusen intraperitoneal injiziert. Als Negativkontrolle diente PBS. Nach 2,5 h wurden die Mäuse abgebaut und Kryoschnitte der Lebern mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Die beiden Ausschnitte rechts zeigen Vergrößerungen des weißen Quadrates im Kanal für die Detektion von LHBs.

4.4 Humorale Immunantwort nach intraperitonealer Immunisierung von C57BL/6N Mäusen mit mSA_preS1/2-beladenen TLMcapsiden

In den vorhergehenden Experimenten konnte beobachtet werden, dass die Verwendung von zellpermeablen TLMcapsiden, beladen mit dem rekombinanten HBV-Antigen mSA_preS1/2, zu einer Diffusion des Vakzins ins Zytoplasma der Zellen, durch Gewebsschichten hindurch und zu einer allgemeinen systemischen Distribution in lebenden Tieren führt. Um die Auswirkungen dieser Zellpermeabilität auf die Immunantwort studieren zu können, wurden Mäuse mit dem Vakzin immunisiert und die B-Zellantwort analysiert.

4.4.1 Das α -mSA_preS1/2-Antikörperlevel von Mäusen ist nach Immunisierung mit TLMcapsiden+mSA_preS1/2 im Vergleich zu Kontrollen erhöht

Um die B-Zellantwort nach der Immunisierung zu untersuchen, wurden Wildtyp C57BL/6N Mäuse (je $n=3$) nach einem *prime–boost–boost*-Protokoll durch intraperitoneale Injektion immunisiert (siehe 3.5.2). Zwischen den Injektionen lag jeweils ein Zeitraum von 10 Tagen. Vor der ersten und vor jeder neuen Injektion wurde durch Punktion des retrobulbären Venenplexus Blut abgenommen und als Serum abzentrifugiert. Dieses Serum wurde in einem selbstentwickelten, nichtkommerziellen α -mSA_preS1/2-ELISA auf Antikörper untersucht. Die letzte Blutentnahme geschah 21 Tage nach dem 2. *Boost*. Dabei wurde die Immunantwort gegen TLMcapside+mSA_preS1/2 ($10\ \mu\text{g} + 2,5\ \mu\text{g}$), Δ TLMcapside+mSA_preS1/2 ($10\ \mu\text{g} + 2,5\ \mu\text{g}$) und mSA_preS1/2 ohne Capside ($2,5\ \mu\text{g}$) in Form des gemessenen Signals spezifischer Antikörper im ELISA ermittelt. Als Negativkontrolle wurde einer Gruppe nur PBS injiziert. Als Kontrollen für die methodische Funktionalität des ELISA wurden der LHBs-spezifische Antikörper MA18/7 (Positivkontrolle) und 10% FCS (Negativkontrolle) verwendet (**Abbildung 25**). Die signifikant höchsten Signale nach dem 2. *Boost* wurden im Serum jener Mäuse ermittelt, welche mit TLMcapsiden+mSA_preS1/2 immunisiert wurden. Durch die Verabreichung von Δ TLMcapsiden gekoppelt mit mSA_preS1/2 oder mSA_preS1/2 ohne Trägercapside wurde ebenfalls ein Antikörpersignal detektiert. Dieses unterscheidet sich aber neben den TLMcapsiden+mSA_preS1/2 nur im Fall von Δ TLMcapsiden+mSA_preS1/2 signifikant von der PBS Negativkontrolle, nicht aber bei Gabe von mSA_preS1/2 alleine. Im Fall der Applikation von freiem mSA_preS1/2 ist das gemittelte Signal allerdings nur etwa halb so hoch, wie jenes der Mäuse, welche mit mSA_preS1/2 gebunden an TLMcapside immunisiert wurden. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das höchste Antikörper-Level nach I.P.-Immunisierung mit beladenen TLMcapsiden ermittelt wurde.

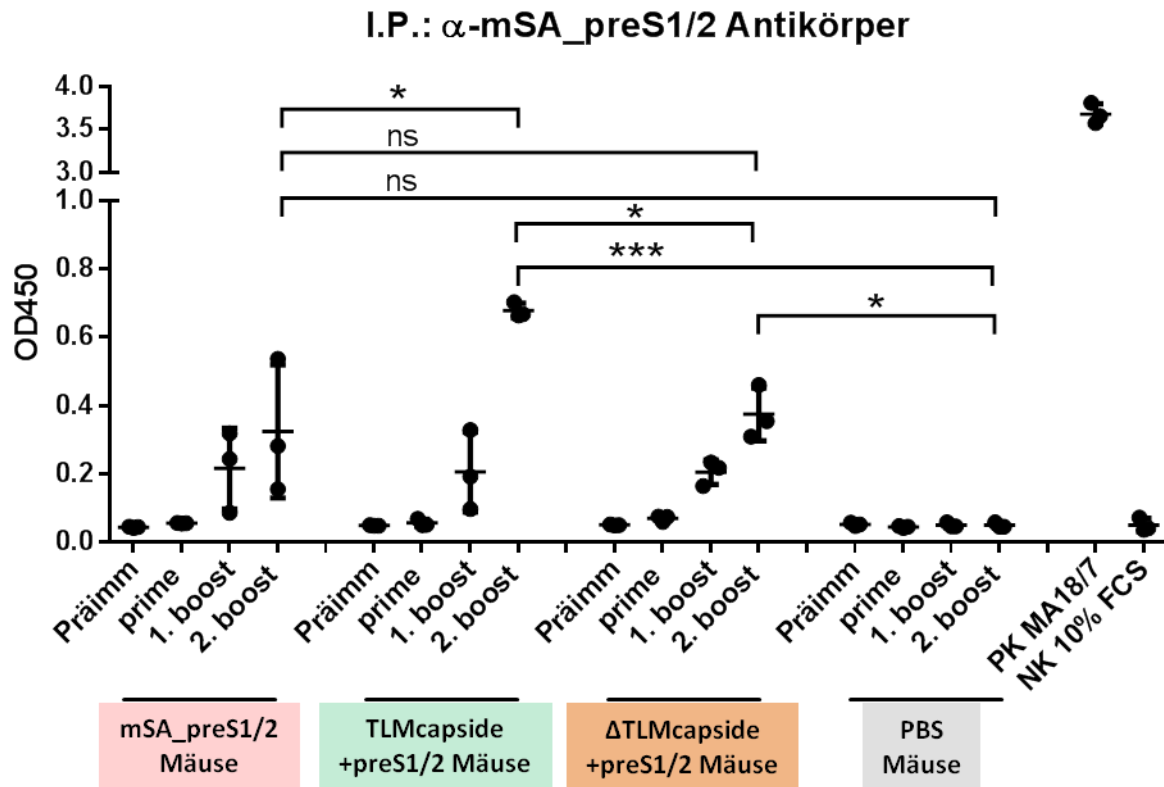


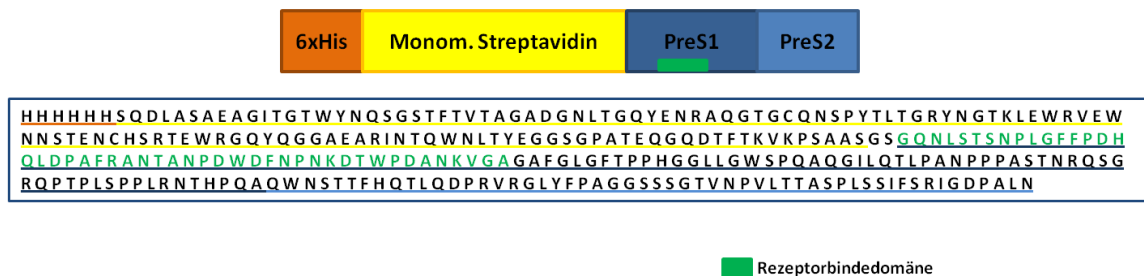
Abbildung 25: Spiegel der mSA_preS1/2-spezifischen Antikörper nach intraperitonealer Immunisierung. Durch einen *prime-boost-boost*-Plan, mit je 10 Tagen zwischen jeder Injektion, wurden Wildtyp C57BL/6N Mäuse (n=3) über die intraperitoneale Route mit TLMcapsiden+mSA_preS1/2 (10 μ g + 2,5 μ g), Δ TLMcapside+mSA_preS1/2 (10 μ g + 2,5 μ g) oder mSA_preS1/2 (2,5 μ g) immunisiert. Das Serum der Mäuse wurde vor der ersten Immunisierung (Präimmunserum), nach dem *prime* sowie nach 1. und 2. *Boost* mittels selbstentwickeltem anti-mSA_preS1/2-spezifischem ELISA untersucht. Die statistische Auswertung erfolgte durch Anwendung von *one-way ANOVA*. ns = nicht signifikant; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

4.4.2 Die Immunisierung von Mäusen mit freiem oder an Trägercapside gebundenem mSA_preS1/2 führt zur Bildung neutralisierender Antikörper

Um die Seren der immunisierten Mäuse bezüglich ihrer Spezifität genauer zu analysieren, wurde eine Epitopbestimmung durchgeführt. Dazu wurden *Microarrays* mit synthetischen, überlappenden Peptiden auf einer Zellulosemembran vorbereitet, welche die gesamte Aminosäuresequenz von mSA_preS1/2 abdecken (**Abbildung 26 a**). Die Peptide wurden in Quadrupeln mit je 72 Peptiden mit 15 Aminosäuren je Peptid und einem Versatz von je 4 Aminosäuren immobilisiert. Diese Arrays wurden dann mit den Seren der immunisierten Mäuse, entnommen drei Wochen nach dem 2. *Boost*, inkubiert. Als Kontrolle für unspezifische Bindungen von Serumkomponenten an die Peptide wurden sie zusätzlich mit dem Präimmunserum derselben Mäuse inkubiert. Die Bindung der Antikörper an die

gespotteten Peptidabfolgen, als Annäherung an Epitope, wurde über einen sekundären, Fluorophor-gekoppelten anti-Maus-Antikörper nachgewiesen. Die Epitopanalyse ergab, dass alle Seren der immunisierten Mäuse im gleichen Sequenzbereich ein Signal erzeugen. Dieser Bereich deckt zudem einen Teil der Rezeptorbindedomäne von PreS1 ab (**Abbildung 26 b**). Insgesamt ist die Signalintensität der Seren von mSA_preS1/2-immunisierten Mäusen höher als die von TLMcapsiden+mSA_preS1/2 und Δ TLMcapsiden+mSA_preS1/2.

a



b

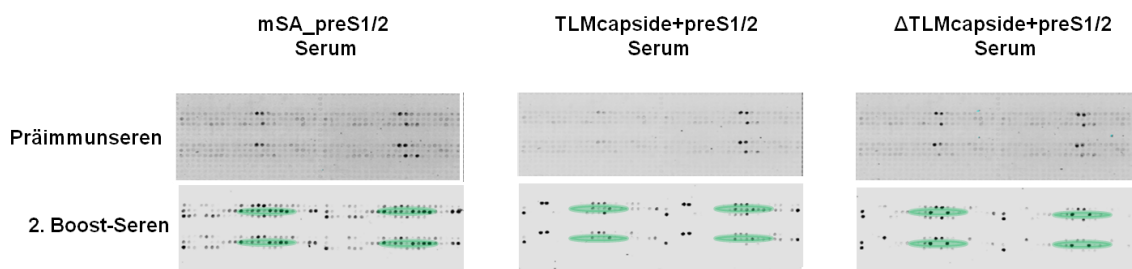


Abbildung 26: Antikörper nach Immunsierung mit freiem oder an Trägercapside gebundenem mSA_preS1/2 decken die Rezeptorbindedomäne im mSA_preS1/2-Peptidarray ab. Die gesamte Peptidsequenz von mSA_preS1/2, welche auch die Rezeptorbindedomäne im PreS1 abdeckt (a), wurde vierfach durch 72 Peptide von 15 Aminosäuren Länge und einem Versatz von 4 auf einem Microarray immobilisiert. Die Peptidarrays wurden mit den Seren von Mäusen vor (Präimmunserum) und nach (2.Boost-Serum) einer Immunsierung mit mSA_preS1/2, TLMcapsiden+mSA_preS1/2 und Δ TLMcapsiden+mSA_preS1/2 inkubiert (b). Das Signal wurde mithilfe eines Fluorophor-gekoppelten Anti-Maus-Antikörpers detektiert. Alle drei Gruppen zeigen Signale im Bereich der Rezeptorbindedomäne des PreS1 (dargestellt als grüner Bereich).

Die Analyse des Peptidarrays ergab, dass durch die Immunsierung Antikörper entstehen, welche vermutlich direkt an die für eine Infektion entscheidende Rezeptorbindedomäne binden und dadurch eine neutralisierende Wirkung haben könnten. Daher wurde nachfolgend untersucht, inwiefern die Seren der immunisierten Tiere das Potential zum Blocken einer HBV-Infektion *in vitro* besitzen. Dazu wurden HepaRG Zellen zwei Wochen lang kultiviert und anschließend weitere zwei Wochen durch Zugabe von 2% DMSO

differenziert, um sie suszeptibel für eine Infektion mit präzipitiertem HBV aus dem Überstand von HBV gtD-positiven HepAD38 Zellen zu machen. Um zu prüfen, ob die Mausseren das Potential für ein Blocken der HBV-Infektion besitzen, wurden diese in verschiedenen Verdünnungen (1:20, 1:50, 1:100, 1:500) für je 2 h bei 37°C mit HBV MOI=1 (*multiplicity of infection*; Multiplizität der Infektion, Verhältnis der Anzahl infektiöser Partikel zu Zielzellen) präinkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf differenzierte HepaRG Zellen gegeben, um eine mögliche Infektion einzuleiten (siehe 3.1.5). Als methodische Positivkontrolle wurde der monoklonale α -LHBs-Antikörper MA18/7 verwendet, welcher in der Lage ist, eine Infektion mit HBV *in vitro* zu blockieren. Zusätzlich wurden Zellen ohne Mausserum infiziert (mit Inf.) und ohne HBV kultiviert (ohne Inf.). Die Infektion wurde 14 Tage lang durch Entnahme und Analyse des Überstandes auf HBsAg mittels HBsAg-ELISA überwacht. Die Auswertung des ELISA ergab, dass die Seren der immunisierten Mäuse eine Infektion Dosis-abhängig reduzieren – ein vollständiges Blocken der Infektion aber nur bei einer minimalen Verdünnung von 1:20 möglich ist (**Abbildung 27 a-c**). Ob eine Infektion vorliegt oder geblockt wurde, wurde anhand des s/cut-off-Wertes (*signal through cut-off*, Signal durch Grenzwert) ermittelt. Beim cut-off handelt es sich um einen vom Hersteller des HBsAg-ELISA vorgeschlagenen Wert, der sich aus dem Signal bei OD₄₅₀ einer Assay-bezogenen methodischen Negativkontrolle plus 0,05 errechnet. Dieser Wert wurde auf 1 gesetzt und jeder Wert oberhalb dieser Grenze entspricht einer HBsAg-positiven Messung, jeder unterhalb für eine HBsAg-negative Messung. Die Anwesenheit von Serum, selbst ohne spezifische mSA_preS1/2-Antikörper, beeinflusst selbst bereits das Infektionsvermögen, führt aber nicht zu einem Blocken einer Infektion, wie für das Serum PBS-injizierter Mäuse zu erkennen ist (**Abbildung 27 d**). Bei einer Verdünnung von 1:20 zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Seren immunisierter Mäuse. Sobald mSA_preS1/2 injiziert wurde, ob mit oder ohne Trägercapsid, führt dies zur Bildung neutralisierender Antikörper, welche bei einer Serumverdünnung von 1:20 eine Infektion blockieren (**Abbildung 27 e**).

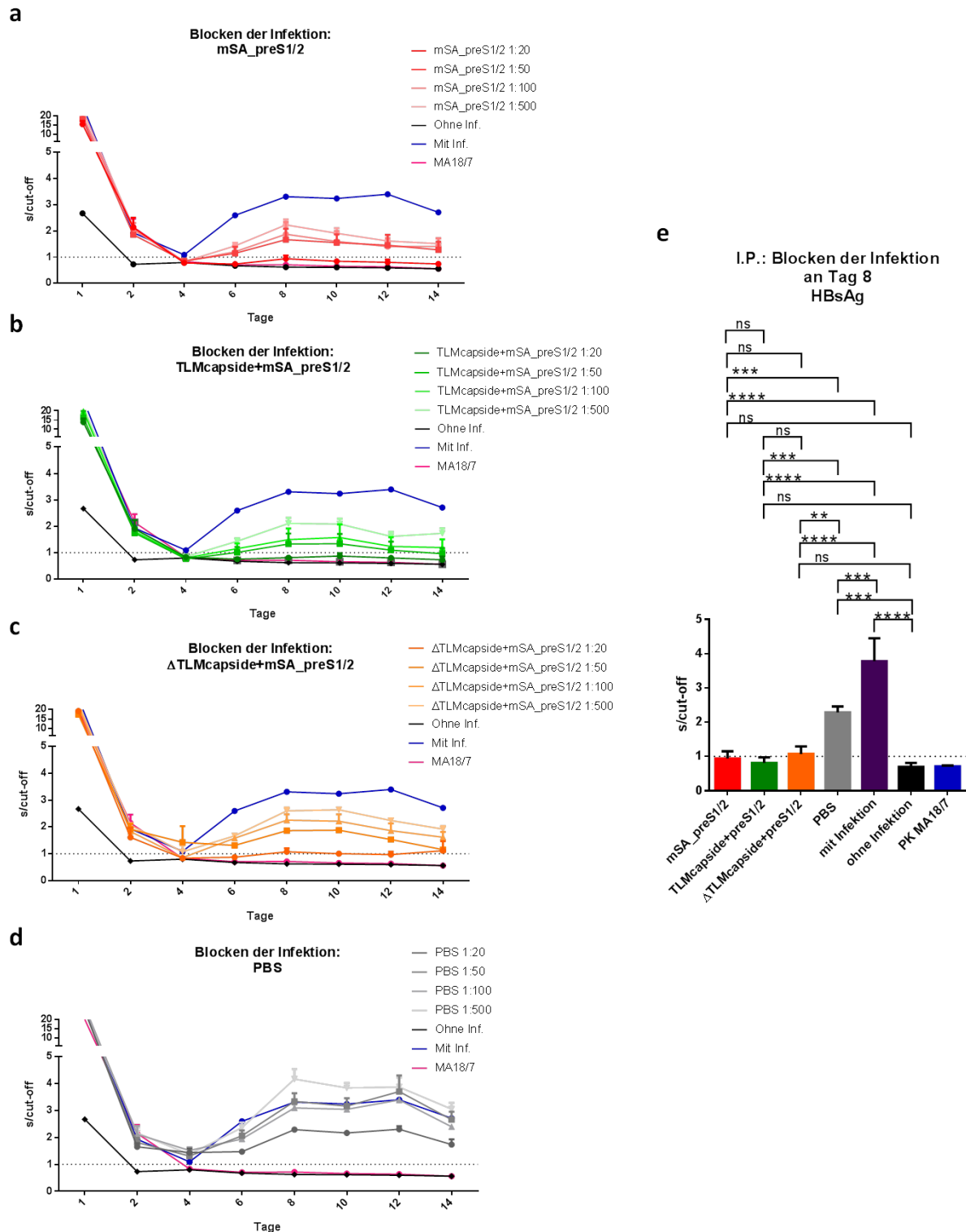


Abbildung 27: Überwachung einer *in vitro* HBV-Infektion nach einer Inkubation mit verdünnten Seren immunisierter Mäuse. Differenzierte HepaRG Zellen wurden mit HBV gtD mit einer MOI=1 infiziert, nachdem das Virusinokulum mit verdünnten Seren von intraperitoneal immunisierten Mäusen inkubiert wurde. Über 14 Tage wurden Zellkulturüberstände gesammelt und die Menge an HBsAg unter Verwendung eines HBsAg-ELISAs überwacht. Inokulum ohne Serum diente als Referenz (mit Inf.), uninfizierte HepaRG Zellen als negative Referenz (ohne Inf.) und Präinkubation mit MA18/7 als Positivkontrolle für ein Blocken der Infektion. Die Seren von mSA_preS1/2 (a), TLMcapsiden+mSA_preS1/2 (b), Δ TLMcapsiden+mSA_preS1/2 (c) oder PBS injizierter Mäuse

(d) wurden je 1:20, 1:50, 1:100 und 1:500 in HepaRG-Medium verdünnt. Zusätzlich wurde die Effizienz des Blockens als Vergleich zwischen allen Proben an Tag 8 mit einer Verdünnung von 1:20 dargestellt (e). Zusammenfassung der Blocking-Experimente je an Tag 8 der Infektion. Alle Werte wurden als s/cut-off berechnet. Der s/cut-off bei 1 ist als gestrichelte Linie dargestellt. Werte oberhalb der Linie wurden als HBsAg-positiv bzw. als Infektion, unterhalb der Linien als HBsAg-negativ bzw. keine Infektion festgelegt. Die statistische Auswertung erfolgte durch Anwendung von *one-way ANOVA*. ns = nicht signifikant; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$.

Die erhobenen Daten weisen zusammenfassend darauf hin, dass zum einen der Spiegel der mSA_preS1/2-spezifischen Antikörper durch die Verwendung beladener, zellpermeabler TLMcapside signifikant erhöht ist und es damit zu einer effektiveren Stimulation der B-Zellantwort kommt. Zum anderen ist für die Produktion neutralisierender Antikörper lediglich die Anwesenheit von mSA_preS1/2 entscheidend, aber nicht, ob dieses über Trägercapside oder frei verabreicht wird.

4.5 Zelluläre Immunantwort nach intraperitonealer Immunisierung von C57BL/6N Mäusen mit mSA_preS1/2-beladenen TLMcapsiden

Wie bereits beschrieben, induziert die Vakzinierung mit TLMcapsiden+mSA_preS1/2 eine starke, humorale Immunantwort. Da für die Effizienz eines therapeutischen Vakzins neben der Produktion von neutralisierenden Antikörpern vor allem die Induktion einer robusten T-Zellantwort entscheidend ist, wurde in den nachfolgenden Experimenten untersucht, inwiefern zellpermeable TLMcapside, beladen mit mSA_preS1/2, die Fähigkeit besitzen spezifische CD8⁺ T-Zellen zu aktivieren, um HBV-positive Zielzellen zu degranulieren.

4.5.1 CD8⁺ T-Zellen von TLMcapsiden+mSA_preS1/2-immunisierten Mäusen zeigen verminderte Granzym A- und erhöhte CD107a-Level als Zeichen einer Reaktivierung

Für eine prinzipielle Untersuchung mSA_preS1/2-spezifischer CD8⁺ T-Zellen wurden die Lymphozyten von immunisierten Mäusen entnommen und 12 h in Kultur gehalten. Im Anschluss wurden sie mit den jeweiligen Vakzinen (25 µg/ml mSA_preS1/2, 100 µg/ml TLM/ΔTLMcapside; selbe Konzentration auch als Kopplungsansatz) für 72 h restimuliert und per FACS (*fluorescence activated cell sorting*, Fluoreszenz-basierte Durchflusszytometrie) auf den Gehalt an intrazellulärem Granzym A analysiert. Bei der Reaktivierung von

zytotoxischen Gedächtnis-T-Zellen durch ihre restringierten Peptide werden vor allem drei Typen von abundanten, granulierenden Enzymen von den CTLs an die zu lysierende Zielzelle abgegeben. Dies sind Perforin sowie Granzym A und Granzym B. Die Messung von intrazellulärem Granzym dient als wichtiger Marker zur Identifikation von spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Zwar wird im Schnitt bei einer Reaktivierung mehr Granzym B als A freigesetzt, die Zahl an Granzym A sekretierenden T-Zellen ist insgesamt aber höher, da manche T-Zellen zwar Granzym A, aber aus ungeklärten Gründen kein oder nur wenig Granzym B freisetzen [266]. Aus diesem Grund wurde im FACS die intrazelluläre Menge an Granzym A gemessen. Da auf eine Vorinkubation mit dem Sekretionshemmer Brefeldin A verzichtet wurde, welcher durch retrograden Transport zu einer Akkumulation der Granzyme am ER der T-Zellen führt, wurde nicht die zunehmende Menge der Enzyme nach Reaktivierung, sondern die Abnahme ermittelt. Als Kontrolle der Spezifität wurden die Lymphozyten von PBS-injizierten Mäusen mit Ovalbumin (OVA) restimuliert. Als Positivkontrolle wurde PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Azetat) und als Negativkontrolle Zellen ohne Restimulation verwendet. Bei der Analyse wurden zunächst CD8⁺ Zellen identifiziert und schließlich der Anteil an CD8⁺ Granzym A⁺ Zellen betrachtet (*gating*) (**Abbildung 28 a**). Die Analyse ergab, dass die Lymphozyten nach Restimulation vergleichbare, verbleibende Mengen an Granzym A zeigten. Zwischen den Mengen an Granzym A der mit mSA_preS1/2, TLMcapsiden+mSA_preS1/2 und ΔTLMcapsiden+mSA_preS1/2 behandelten Zellen besteht kein signifikanter Unterschied. Die OVA-Kontrolle zeigte hingegen nur eine geringe Sekretion an Granzym A im Vergleich zu den unstimulierten T-Zellen, was für eine spezifische Reaktivierung der Gedächtniszellen nach Restimulation mit den Vakzinen spricht. Die Positivkontrolle PMA zeigt etwa den gleichen Anteil doppelt positiver Zellen (CD8⁺/Granzym A⁺) wie die Vakzine. Als Experiment zur Verifizierung dieses zytolytischen Potentials der Effektorzellen wurde zusätzlich die Oberflächenexpression von CD107a nach Co-Kultivierung mit HBV-exprimierenden AML12 Zielzellen bestimmt. Bei CD107a, auch als LAMP-1 (*lysosomal-associated membrane protein 1*, Lysosom-assoziiertes Membranprotein 1) bezeichnet, handelt es sich um einen Surrogatmarker zur Identifizierung zytotoxisch-aktiver Zellen, welcher auf der Oberfläche exponiert wird, sobald eine CD8⁺-induzierte Degranulation vorliegt [267,268]. Die Produktion von CD107a sowie auch Granzym A, steht in direkter Korrelation mit der CTL-Aktivität *in vivo* [269]. Bei der Restimulation durch Kontakt mit den HBV-positiven Zielzellen und Färbung von CD107a wurde diesmal der Transportinhibitor Brefeldin A sowie Monensin verwendet. Da es während der Stimulationsphase auch zu einer teilweisen Reinternalisierung von CD107a kommt, werden gebundene anti-CD107a-Antikörper ins endosomale oder lysosomale Kompartiment gebracht, wo sie aufgrund der Proteasen und der Azidität in der Fluoreszenz ihrer Fluorochrome beeinflusst werden. Um diese Fluoreszenzabschwächung zu verhindern, wurde zusätzlich Monensin hinzugefügt, welches den pH-Wert des Endosoms

und Lysosoms neutralisiert [270]. Da es in diesem Design zu keiner Abnahme an CD107a durch Stimulation, sondern zu einer Akkumulation kommt, sind die Ergebnisse reziprok zu den Werten zu **Abbildung 28 a** zu verstehen. Als Kontrolle dienten Lymphozyten von PBS-injizierten Mäusen ohne Co-Kultivierung mit den Zielzellen (**Abbildung 28 b**). Das basale Auftreten von CD107a⁺ CD8⁺ T-Zellen liegt bei etwa 2%. Etwa diesen Wert zeigen auch die Lymphozyten von mSA_preS1/2 und Δ TLMcapsiden+mSA_preS1/2 immunisierten Mäusen sowie jene, welche lediglich PBS injiziert bekommen haben. Die höchsten gemessenen Werte an CD107a zeigen Lymphozyten der Mäuse, welche zuvor mit TLMcapsiden+mSA_preS1/2 immunisiert wurden. Mit etwa 7% liegt der Wert hier etwa um das 3,5-fache über dem Hintergrundsignal.

Die Daten der Granzym A Messung lassen auf die Präsenz von CD8⁺ T-Zellen schließen, welche spezifisch gegen das jeweilige HBV-abgeleitete Vakzin gerichtet sind. Die CD107a Messung suggeriert, dass einzig die Lymphozyten der TLMcapside+mSA_preS1/2 vakzinieren Mäuse zusätzlich eine Aktivität nach der allgemeinen Restimulation durch HBV-positive Zielzellen und nicht nur durch das Vakzin selbst zeigen.

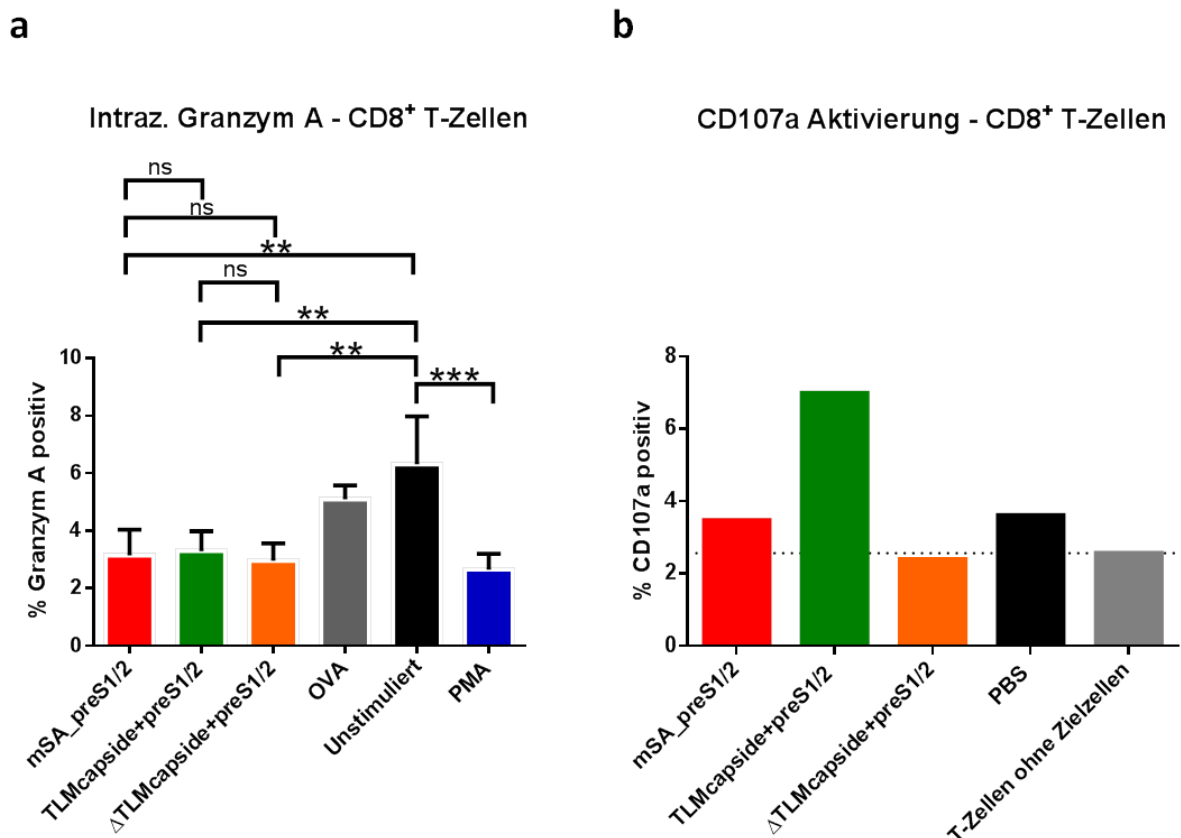


Abbildung 28: FACS-Analyse von intrazellulärem Granzym A und CD107a. Lymphozyten von immunisierten Mäusen wurden mit dem jeweiligen Vakzin für 72 h restimuliert. In der FACS-Messung wurden zunächst die CD8⁺ T-Zellen visuell isoliert und anschließend die Menge an Granzym A dieser CD8⁺ Zellen betrachtet. Durch die

Sekretion von Granzym A nimmt die intrazelluläre Menge des Enzyms nach Stimulation ab (**a**). Wurden Lymphozyten mit HBV gtD-exprimierenden AML12 Zellen für 72 h co-kultiviert, so nimmt die Menge an CD8⁺ CD107a⁺ doppelt positiven Zellen, als Surrogatmarker für CD8⁺-Degranulation, aufgrund der Zugabe von Brefeldin A und Monensin nach Kontakt mit den Zellen zu (**b**). Die statistische Auswertung erfolgte durch Anwendung von *one-way ANOVA*. ns = nicht signifikant; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

4.5.2 HBV-positive Hepatozyten werden *in vitro* durch TLMcapside+mSA_preS1/2-spezifische CD8⁺ T-Zellen eliminiert

Um zu überprüfen, ob die Aktivierung von spezifischen CD8⁺ T-Zellen auch direkt zu einer zytotoxischen Lyse von HBV-positiven Zellen führt, wurden die Lymphozyten der immunisierten Mäuse mit murinen AML12 Hepatozyten, welche zuvor mit HBV gtD transfiziert wurden, co-kultiviert. Die Effektorzellen (EC) und HBV-exprimierenden Zielzellen (TC) wurden in einem TC:EC Verhältnis von 1:10 für 24 h inkubiert. Um eine Aussage über die zytotoxische Aktivität der Effektorzellen machen zu können, wurde die verbleibende Menge an HBV-positiven AML12 im Vergleich zu unbehandelten Zellen verglichen. Die Zielzellen wurden daher nach Ablauf der 24 h fixiert und mit HBVcore-spezifischem Antiserum gefärbt. Die Analyse des HBVcore-Signals fand mittels CLSM statt. Die mikroskopische Analyse ergab, dass die Co-Inkubation mit Lymphozyten grundsätzlich zu einer Abnahme des HBVcore-Signals führt. Jedoch verblieb eine deutlich geringere Zahl HBV-positiver Zellen nach Co-Kultivierung mit TLMcapsiden+mSA_preS1/2 Lymphozyten, im Vergleich zu jenen Zielzellen, welche mit Lymphozyten von mSA_preS1/2 oder Δ TLMcapsiden+mSA_preS1/2 inkubiert wurden (**Abbildung 29 a**). Um den visuellen Eindruck der indirekten Immunfluoreszenzfärbung vergleichen zu können, wurde das HBVcore-spezifische Signal der Bilder quantifiziert (**Abbildung 29 b**). Hier zeigte sich, dass ein bis zu zehnfach geringeres Signal für HBVcore im Vergleich zu den Kontrollen in jenen Zielzellen detektiert wurde, welche zuvor mit Lymphozyten von TLMcapsiden+mSA_preS1/2 inkubiert wurden. Dies bedeutet, dass eine größere Elimination der HBV-positiven Zellen durch CTLs stattgefunden haben muss. Zusätzlich zur Quantifizierung des Signals HBV-positiver Zielzellen wurde die Menge an Interferon- γ (IFN γ) im Überstand der Co-Kultur mittels IFN γ -ELISA analysiert (**Abbildung 29 c**). Der Vergleich der Menge an produziertem IFN γ zwischen Lymphozyten, welche mit HBV-transfizierten und untransfizierten Zielzellen inkubiert wurden, zeigt, dass lediglich die TLMcapside+mSA_preS1/2 Lymphozyten spezifisch und signifikant als Reaktion auf den Kontakt mit HBV erhöhte Mengen IFN γ produzieren. Alle anderen Kontrollen zeigen keine spezifische Interferonantwort. Zudem ist die Menge an IFN γ in den Zellkulturüberständen bei Verwendung von Lymphozyten der TLMcapsiden gekoppelt mit mSA_preS1/2 immunisierten Mäuse nach Kontakt mit HBV-

positiven AML12 signifikant höher als jede der verwendeten Kontrollen und zeigt den einzigen signifikanten Unterschied zur PBS-Kontrollgruppe.

Die Ergebnisse argumentieren dafür, dass TLMcapside, als Antigenträger, das Potential besitzen, eine starke zelluläre Immunantwort gegen HBV zu induzieren, was sich in der erhöhten Zahl eliminerter HBV-positiver Hepatozyten und einer erhöhten IFN γ -Produktion zeigt.

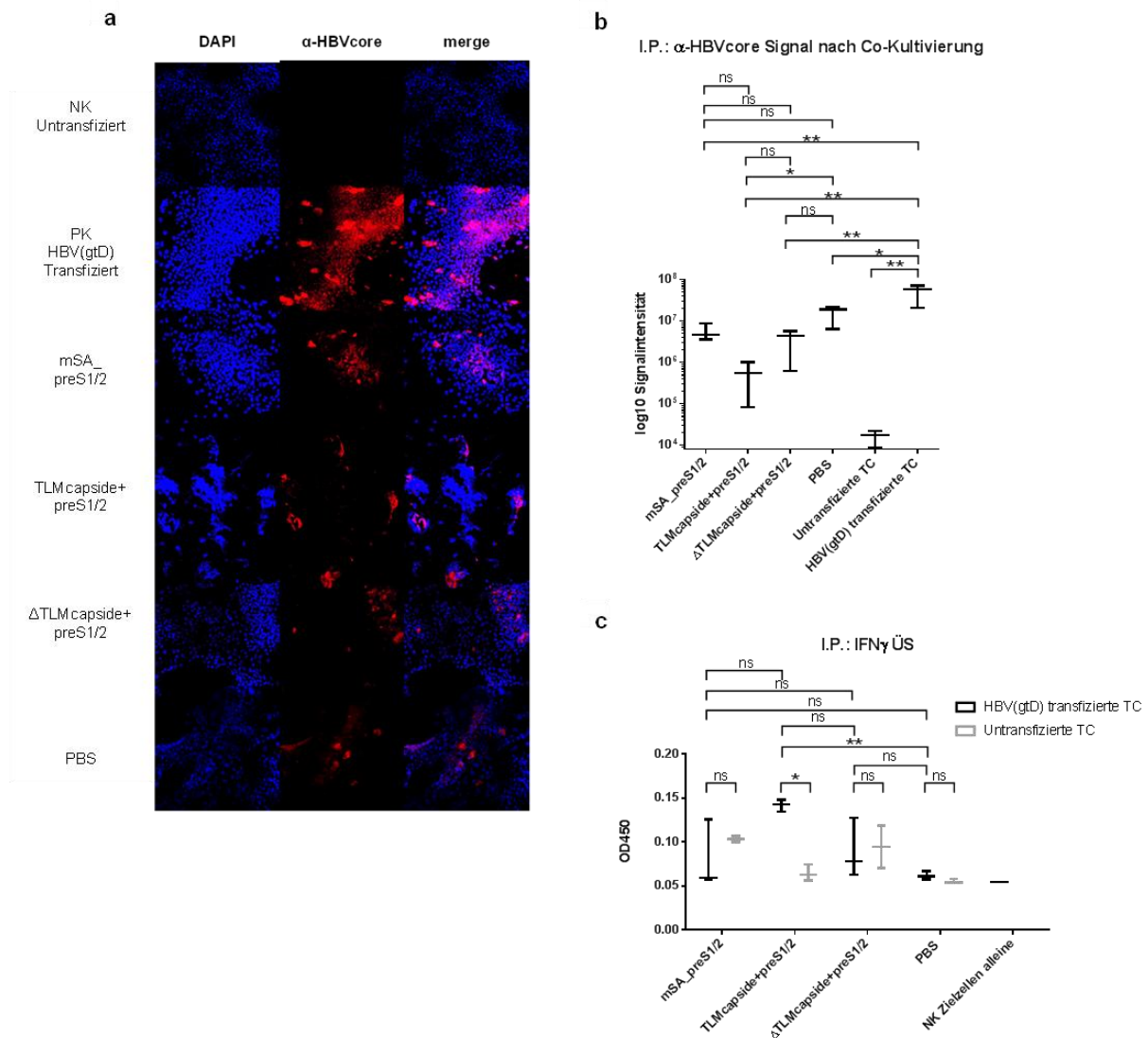


Abbildung 29: Lyse von HBV-positiven AML12 Zellen nach Co-Kultivierung mit Lymphozyten immunisierter Mäuse. C57/BL6N Mäuse wurden mit TLMcapsiden+mSA_preS1/2 und Kontrollen über I.P.-Injektion immunisiert und die Lymphozyten für 24 h mit HBV gtD transfizierten murinen AML12 co-kultiviert. Das EC:TC Verhältnis betrug 1:10. (a) Die Menge an verbliebenen HBV-positiven Zielzellen nach 24 h wurde mittels HBVcore-spezifischem Antiserum (rot) und indirekter Immunfluoreszenzfärbung bestimmt. Nuklei wurden mit DAPI (blau) angefärbt. (b) Die HBVcore-spezifische Signalintensität aus (a) wurde mittels der Zeiss ZEN Software berechnet. (c) Die Menge an IFN γ im Überstand nach Co-Kultivierung mit HBV gtD transfizierten und

untransfizierten AML12 wurde mittels ELISA bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte durch Anwendung von *one-way ANOVA*. ns = nicht signifikant; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

4.6 Transdermale und oral-mukosale Immunisierung von Mäusen als alternative Routen basierend auf zellpermeablen TLMcapsiden

Inspiziert von der Fähigkeit der TLMcapside nicht nur Zellmembranen zu passieren, sondern auch durch ganze Gewebsschichten hindurch zu diffundieren, wurden zwei alternative Immunisierungsrouten evaluiert, welche die permeablen Eigenschaften der TLMcapside für das Erreichen von APCs nutzen. Einerseits wurde überprüft, inwiefern die Gabe eines Vakzins über ein Transdermalpflaster erfolgen kann (transdermal) – um durch die obersten Hautschichten zu migrieren und die darunter liegenden Langerhans Zellen zu erreichen. Auf der anderen Seite wurde getestet, ob eine Aufnahme des Vakzins nur über die Schleimhäute im Maul von Mäusen stattfinden kann (oral-mukosal) und dies zu einer HBV-spezifischen Immunantwort führt.

4.6.1 mSA_preS1/2-beladene TLMcapside migrieren durch die Haut von Mäusen *ex vivo*

Als ersten Ansatz, ob es möglich ist, Mäuse transdermal über ein Pflastersystem zu immunisieren, wurde überprüft, ob es zu einer prinzipiellen Aufnahme über die Haut kommen kann, wenn das zellpermeable Vakzin auf die obersten Hautschichten aufgetragen wird. Dazu wurde die Haut auf dem Rücken von C57BL/6N Mäusen entnommen und in 1 cm² große Stücke geschnitten. Die Haut wurde flach und bis zur vertikalen Hälfte in eine Petrischale mit Zellsieb und RPMI1640 Medium gelegt (siehe 3.1.4). Auf die äußerste Hautschicht wurden TLMcapside+mSA_preS1/2 sowie die Kontrollen Δ TLMcapside+mSA_preS1/2 und freies mSA_preS1/2 hinzugegeben und durch das Pflastersystem abgedeckt (**Abbildung 11**). Nach einer Inkubationszeit von 6 h wurden 10 μ m dicke Kryomikrotomschnitte von den Häuten angefertigt, mit HBVcore und LHBs-spezifischen Antikörpern gefärbt und per CLSM analysiert. Die Struktur der Häute wurde durch Färbung der Nuklei und F-Aktin sichtbar gemacht. Die Färbung der Schnitte ergab, dass HBVcore lediglich in den einzelnen Hautschichten von mit TLMcapsiden+mSA_preS1/2 inkubierter Haut nachgewiesen werden konnte. Bei der Verwendung impermeabler Δ TLMcapside+mSA_preS1/2 konnte hingegen kein Core detektiert werden. Die Anwesenheit von mSA_preS1/2 konnte ebenfalls nur unter Verwendung von TLMcapsiden als Träger oder, in wesentlich geringerem Maße, als freies mSA_preS1/2 nachgewiesen werden. Diese

Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine TLM-induzierte Diffusion der Capside durch die verschiedenen Schichten der Haut prinzipiell möglich ist und damit auch eine Immunisierung auf diesem Wege möglich sein sollte.

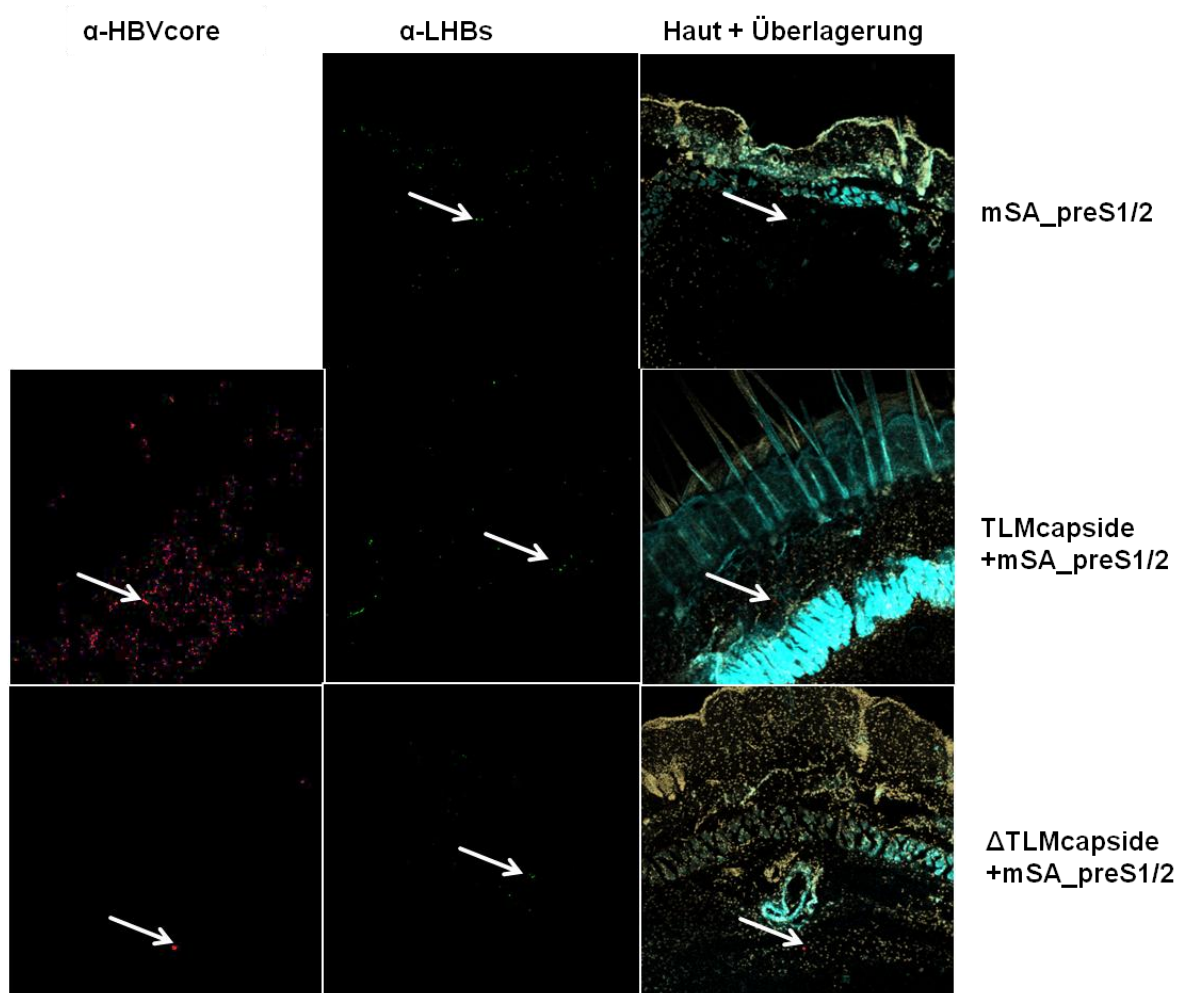


Abbildung 30: Transdermale Aufnahme von Vakzin und Kontrollen *ex vivo*. Kryoschnitte von Häuten von C57BL/6N Mäusen wurden mit freiem oder Trägercapsid-gebundenem mSA_preS1/2 (100 µg/ml Antigen; 200 µg/ml Capside) für 6 h bei 37°C inkubiert. Dazu wurde ein transdermales Pflastersystem verwendet. Immunfluoreszenzfärbung zeigt die Migration der beladenen TLMcapside durch die Hautschichten. Zum Nachweis der Proteine wurden die Häute mit α-HBVcore (rot) und α-LHBs (grün) gefärbt. Die Struktur der Haut wurde durch die Färbung mit DAPI (golden) und Phalloidin-633 (türkis) verdeutlicht.

4.6.2 Induktion einer humoralen Immunantwort nach transdermalen oder oral-mukosalen Immunisierung ist durch TLMcapside möglich

In Anbetracht der Beobachtungen, dass Antigen-beladene TLMcapside auch durch Hautschichten diffundieren können, wurde ein Pflastersystem konzipiert, um eine Antigenaufnahme über epidermal residente Langerhans-Zellen zu gewährleisten. Um dies

experimentell zu untersuchen, wurde C57BL/6N Mäusen (je $n=3$) freies mSA_preS1/2 ($2,5 \mu\text{g}$) oder gebunden an TLMcapside bzw. $\Delta\text{TLMcapside}$ (je $10 \mu\text{g}$) auf die rasierte Rückenhaut aufgetragen und mit einem Pflaster fixiert (siehe 3.5.2). Dabei diente die Gabe von PBS als Negativkontrolle. Als methodische Kontrollen für die Funktionalität des ELISAs wurden der LHBs-spezifische Antikörper MA18/7 als Positivkontrolle und 10% FCS als Negativkontrolle verwendet. Die Immunisierung folgte, wie auch bei der I.P. Immunisierung, einem *prime-boost-boost*-Protokoll mit je einem Zeitraum von 10 Tagen zwischen den drei Applikationen. Vor jeder Verabreichung und 21 Tage nach dem 2. *Boost* wurde den Tieren über den retrobulbären Venenplexus Blutabgenommen und das Serum mittels eines mSA_preS1/2-ELISA auf spezifische Antikörper untersucht (**Abbildung 31**). Eine messbare Antikörperantwort konnte lediglich bei der Verwendung von TLMcapsiden+mSA_preS1/2 detektiert werden, aber bei keiner der Kontrollen. Aus dieser Gruppe zeigte nur eine der Mäuse eine Antwort. Allerdings nahm der Spiegel an spezifischen Antikörpern mit jeder Applikation zu, was gegen einen methodischen Fehler des ELISA spricht und es bei dieser Maus tatsächlich zu einer Pflaster-vermittelten, transdermalen Immunantwort kam.

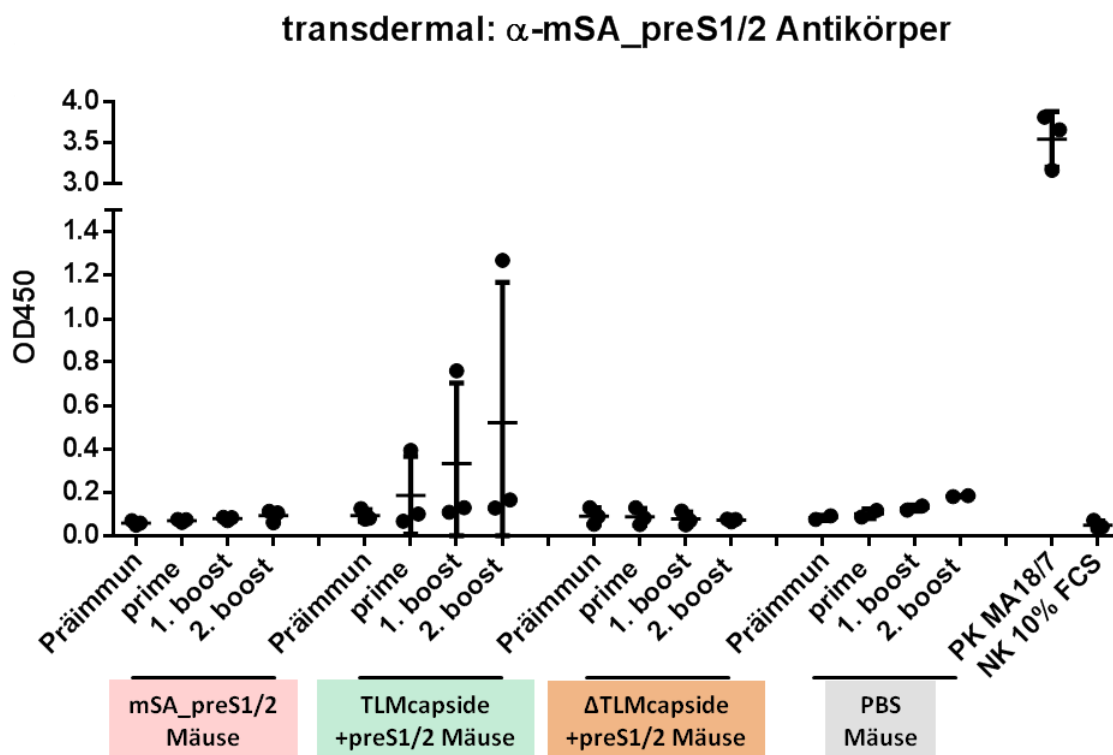


Abbildung 31: Antikörperantwort nach transdermalen Immunisierung. C57BL/6N Mäuse wurden nach einem zweifachen *Boost*-Protokoll mit je 10 Tagen Pause zwischen den Applikationen mittels Pflaster transdermal vakziniert. Dabei wurden $20 \mu\text{l}$ von je $10 \mu\text{g}$ TLMcapside oder $\Delta\text{TLMcapside}$ und $2,5 \mu\text{g}$ mSA_preS1/2, frei oder gebunden an die Trägercapside, verwendet. Das Serum der Mäuse wurde vor der ersten Immunisierung

(Präimmunserum), nach dem *prime* sowie nach 1. und 2. *Boost* mittels anti-mSA_preS1/2-spezifischem ELISA untersucht. n=3 Mäuse.

Neben der transdermalen Immunisierung wurde getestet, ob die TLM-vermittelte Diffusion durch Gewebeschichten auch zu einer Immunantwort führt, wenn das Vakzin oral-mukosal über die Mundschleimhäute von Mäusen verabreicht wird. Dazu wurden C57BL/6N Mäuse (n=3) in einem Volumen von 15 µl mSA_preS1/2 (2,5 µg) frei oder gebunden an je 10 µg Trägercapside ins Maul pipettiert. Um ein Schlucken des Vakzins und der Kontrollen zu verhindern, wurden die Tiere zuvor mit Isofluran sediert. Auch hier wurde einer Gruppe lediglich PBS als Negativkontrolle verabreicht. Das Immunisierungsprotokoll folgte in den Applikationen zeitlich denen der I.P. und transdermalen Immunisierung (**Abbildung 32**). Auch hier zeigt sich lediglich eine detektierbare, mSA_preS1/2-spezifische Antikörperantwort, wenn die Mäuse mit den permeablen TLMcapsiden+mSA_preS1/2 immunisiert wurden, aber weder nach Gabe von freiem mSA_preS1/2, noch nach Gabe der impermeablen Δ TLMcapside+mSA_preS1/2. Im Unterschied zu den Immunisierungen über die intraperitoneale oder transdermale Route (**Abbildung 25** und **Abbildung 31**) ist erst nach dem 2. *Boost* ein spezifisches Antikörpersignal detektierbar.

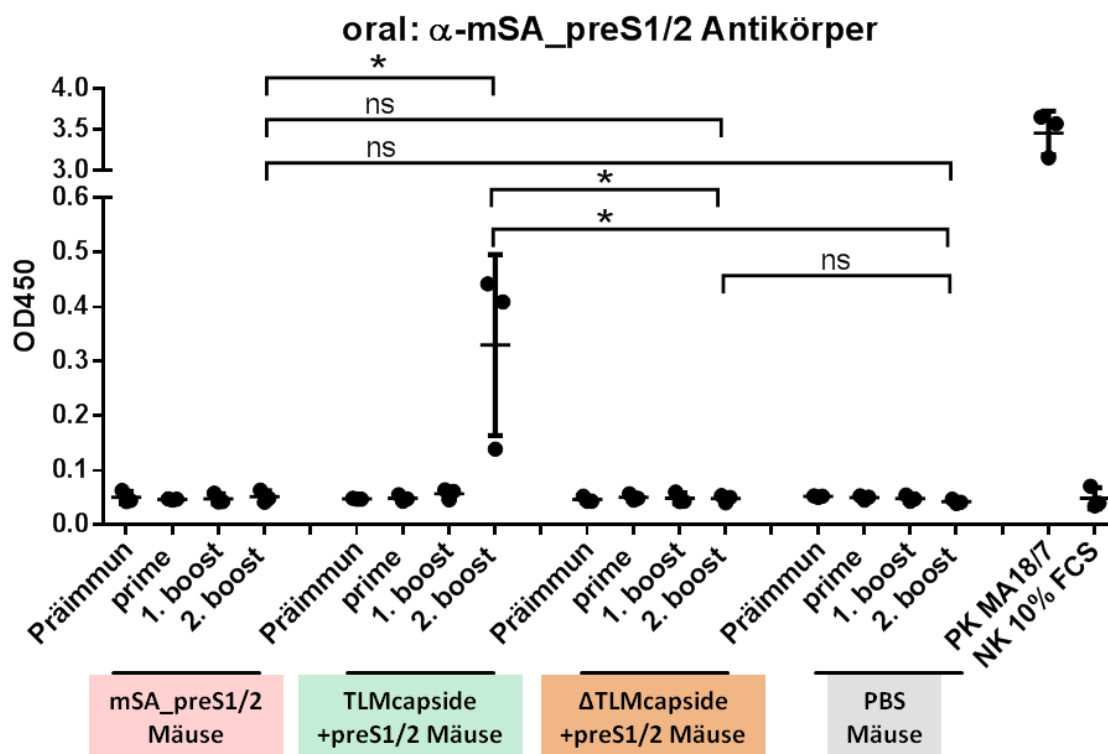


Abbildung 32: Antikörperantwort nach oral-mukosaler Immunisierung. C57BL/6N Mäuse wurden nach einem zweifachen *Boost*-Protokoll mit je 10 Tagen Pause zwischen den Applikationen mittels oraler Gabe des

Vakzins und der Kontrollen in den Mundraum der Tiere vakzinieren. Dabei wurden 15 µl von je 10 µg TLMcapside oder Δ TLMcapside und 2,5 µg mSA_preS1/2, frei oder gebunden an die Trägercapside, verwendet. Das Serum der Mäuse wurde vor der ersten Immunisierung (Präimmunserum), nach dem *prime* sowie nach 1. und 2. *Boost* mittels anti-mSA_preS1/2-spezifischem ELISA untersucht. n=3 Mäuse. Die statistische Auswertung erfolgte durch Anwendung von *one-way ANOVA*. ns = nicht signifikant; * = p<0,05.

Während die Kontrollen mSA_preS1/2 und Δ TLMcapside+mSA_preS1/2 nur im Falle einer intraperitonealen Vakzinierung eine Antikörperantwort in den Tieren induzieren, können die zellpermeablen TLMcapside+mSA_preS1/2 für alle drei Routen für die Induktion einer B-Zellantwort verwendet werden. Die Ausprägung der Antwort im Sinne der Produktion spezifischer Antikörper unterscheidet sich zwischen den einzelnen Routen bei Verwendung der permeablen Trägercapside nur unwesentlich und ist nicht signifikant (**Abbildung 33**). Im Falle der transdermalen Immunisierung zeigte jedoch eine Maus eine deutliche B-Zellantwort, welche sich in einem höheren Antikörpersignal im ELISA ausdrückte als jede Messung der intraperitonealen oder oralen Gruppe.

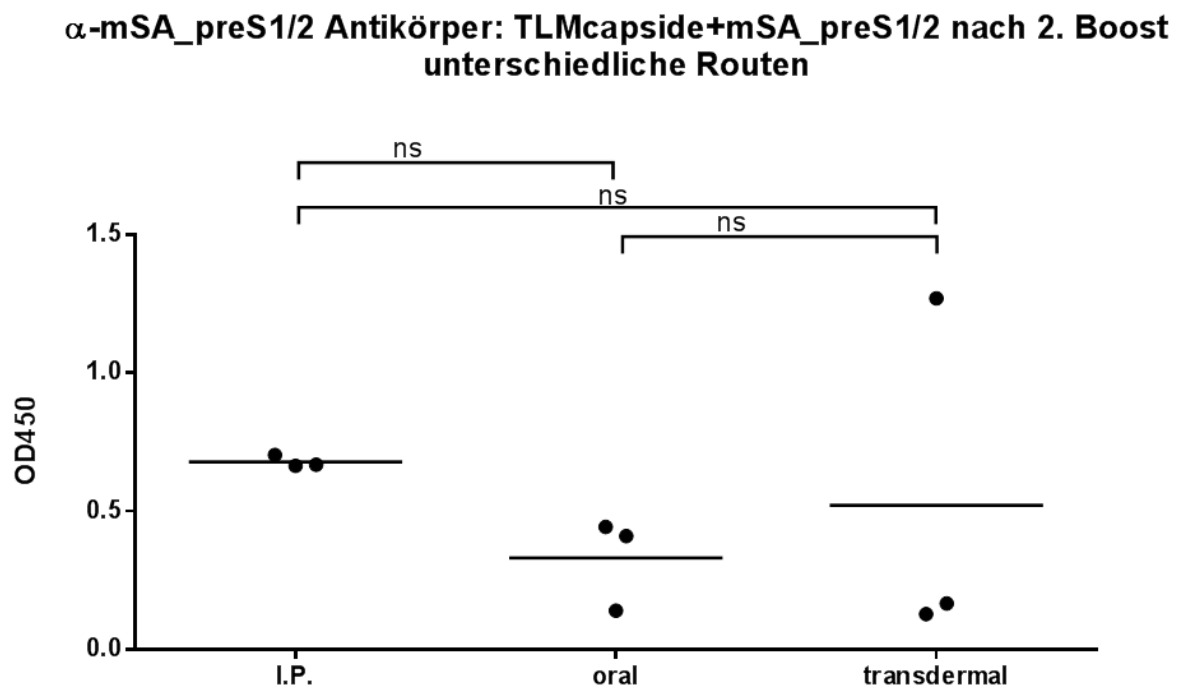


Abbildung 33: Vergleich der Antikörperantwort bei Verwendung verschiedener Immunisierungsrouten. Die Antikörperlevel bei Verwendung von TLMcapsiden+mSA_preS1/2 nach dem 2. *Boost* für die Routen intraperitoneal (I.P.), oral und transdermal. Das Serum der Mäuse wurde mittels anti-mSA_preS1/2-spezifischem ELISA untersucht. n=3 Mäuse. Die statistische Auswertung erfolgte durch Anwendung von *one-way ANOVA*. ns = nicht signifikant.

Die Experimente zur Ermittlung der Antikörperproduktion nach Verwendung der alternativen Immunisierungsrouten transdermal und oral lassen die Schlussfolgerung zu, dass die zellpermeablen Eigenschaften der TLMcapside prinzipiell zur Stimulation einer B-Zellantwort über nichtinvasive Vakzinierung genutzt werden können.

4.6.3 Transdermale und oral-mukosale Immunisierung mit beladenen TLMcapsiden führt zur Produktion neutralisierender Antikörper

Wie in Kapitel 4.4.2 beschrieben bzw. in **Abbildung 27** dargestellt, wurde in der nachfolgenden Analyse überprüft, ob die Anwesenheit der mSA_preS1/2-spezifischen Antikörper im Serum der TLMcapside+mSA_preS1/2-immunisierten Mäuse eine Infektion mit HBV *in vitro* blockieren kann. Hierfür wurden ebenfalls differenzierte HepaRG Zellen mit präzipitiertem HBV aus dem Überstand von HBV gtD-positiven HepAD38 Zellen infiziert. Zuvor wurde der HBV-Stock für 2 h bei 37°C mit einer MOI=1 mit 1:20 verdünntem Serum der Mäuse präinkubiert. Um eine Infektion einzuleiten wurde der Ansatz für 16 h bei 37°C zu den differenzierten HepaRG gegeben und die Zellen für 2 Wochen in Kultur gehalten. Alle zwei Tage wurde Überstand entnommen und mittels ELISA die Menge an HBsAg bestimmt. Aufgrund der fehlenden Immunantwort nach der Immunisierung mit mSA_preS1/2 und Δ TLMcapsiden+mSA_preS1/2 wurde lediglich das Serum der Mäuse untersucht, welche mit Antigen-beladenen TLMcapsiden immunisiert wurden. Sowohl der Einsatz des Serums der transdermal vakzinierten Mäuse (**Abbildung 34 a**) wie auch das der oral-mukosal vakzinierten Mäuse (**Abbildung 34 b**) führen zu einer Reduktion des HBsAg-Levels auf einen s/cut-off-Wert von etwa 1 am Tag 8 der Infektion. Dieser Wert entspricht laut der angewandten Definition einem Fehlen der Infektion. Da in beiden Gruppen der Wert allerdings minimal darüber liegt, ist nicht eindeutig zu sagen, ob es zu einer vollständigen Neutralisation oder nur zu einer verminderten Infektion gekommen ist. Bei Betrachtung der Kontrollen „ohne Infektion“ sowie „PK MA18/7“ ist zu erkennen, dass das vollständige Ausbleiben einer Infektion durch einen Wert deutlich unter 1 gekennzeichnet ist. Nichtsdestotrotz weisen die Daten aus der transdermalen und oralen Gruppe mindestens auf einen blockierenden Effekt hin, wenn die HBsAg-Level von TLMcapside+mSA_preS1/2 mit denen der PBS-Kontrolle verglichen werden.

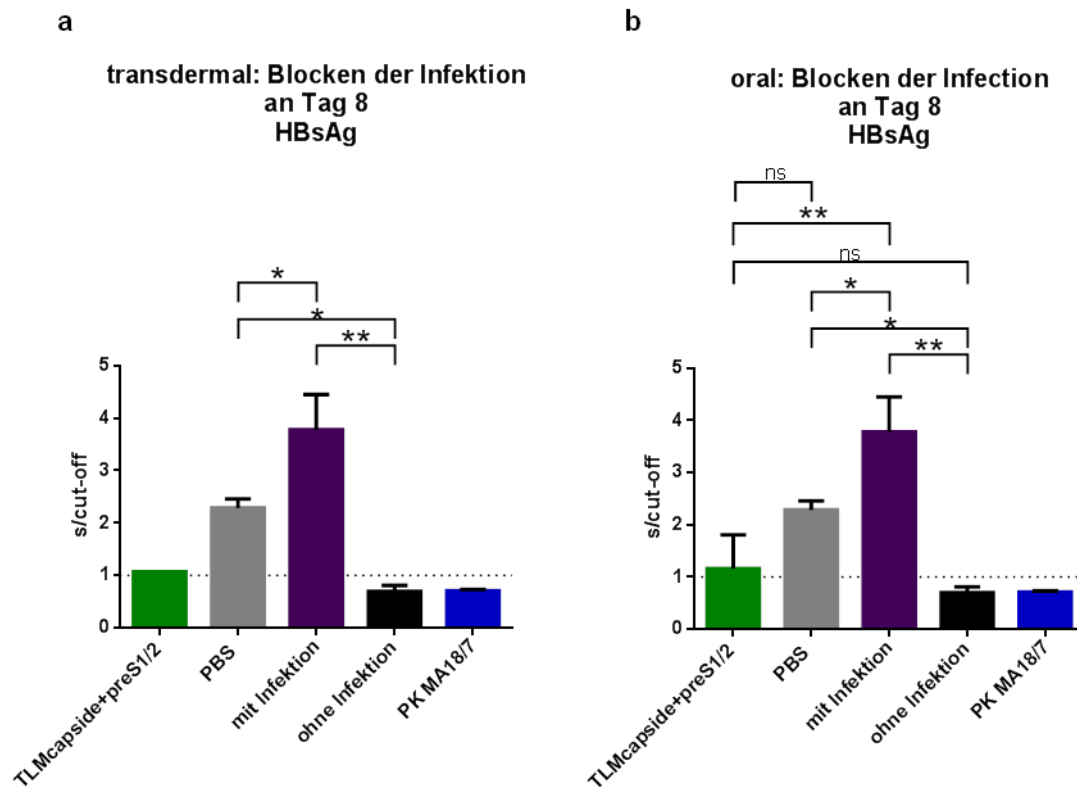


Abbildung 34: HBsAg-Level an Tag 8 einer *in vitro* HBV-Infektion nach Präinkubation mit 1:20 verdünnten Seren transdermal und oral immunisierter Mäuse. Differenzierte HepaRG Zellen wurden mit HBV gtD mit einer MOI=1 infiziert, nachdem das Virusinokulum mit 1:20 verdünnten Seren von transdermal (a) und oral (b) immunisierten Mäusen inkubiert wurde. Über 14 Tage wurden Zellkulturüberstände gesammelt und die Menge an HBsAg über einen HBsAg-ELISA überwacht. Dargestellt ist Tag 8 der Infektion. Inokulum ohne Serum diente als Referenz (mit Infektion), uninfizierte HepaRG Zellen als negative Referenz (ohne Infektion) und Präinkubation mit MA18/7 als Positivkontrolle für ein Blocken der Infektion. Alle Werte wurden als s/cut-off berechnet. Der s/cut-off bei 1 ist als gestrichelte Linie dargestellt. Werte oberhalb der Linie wurden als HBsAg-positiv bzw. als Infektion, unterhalb der Linien als HBsAg-negativ bzw. keine Infektion festgelegt. Die statistische Auswertung erfolgte durch Anwendung von *one-way ANOVA*. ns = nicht signifikant; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

Zusammengefasst kann aus den Experimenten zur humoralen Immunantwort nach transdermalen und oraler Immunisierung geschlossen werden, dass in dem verwendeten Aufbau lediglich beladene TLMcapside in der Lage waren, eine Immunantwort durch die Hautschichten hinweg sowie über die Mundschleimhäute der Tiere zu initiieren. Kommt es zu einer Induktion von mSA_preS1/2-spezifischen Antikörpern, so haben diese auch vermutlich neutralisierenden, mindestens aber blockierenden Charakter gegenüber einer HBV-Infektion.

4.6.4 Nach oraler und transdermalen Immunisierung von Mäusen werden HBV-positive Hepatozyten *in vitro* durch TLMcapside+mSA_preS1/2-spezifische CD8⁺ T-Zellen eliminiert

Um zu überprüfen, ob die diffusive Aufnahme der beladenen TLMcapside über die Gewebeschichten nicht nur zu einer neutralisierenden humoralen, sondern auch zu einer zytotoxischen zellulären Immunantwort führt, wurden die Splenozyten der oral und die Lymphozyten der transdermal immunisierten Mäuse mit HBV gtD-transfizierten, murinen AML12 Zellen co-inkubiert. Die Zellen wurden für 24 h in einem TC:EC-Verhältnis von 1:10 inkubiert und die verbleibende Menge an HBV-positiven Zielzellen mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung und CLSM ausgewertet. Der zytotoxische Effekt der Splenozyten von mit beladenen TLMcapsiden oral immunisierten Mäusen wurde mit jenen der beladenen Δ TLMcapsid-Gruppe und der PBS-Gruppe verglichen. Als Negativ- und Positivkontrolle für das HBVcore-Signal dienten untransfizierte und HBV-transfizierte AML12. Die Auswertung ergab, dass die Anwesenheit von Splenozyten grundsätzlich zu einem Sterben der Zielzellen führt – dies jedoch in unterschiedlichem Maße. Während in der TLMcapsid+mSA_preS1/2-Gruppe kein HBVcore-Signal zu erkennen ist, zeigen die Vergleichsgruppen noch Signale von positiven Zellen (**Abbildung 35 a**). Die quantifizierte Signalintensität von HBVcore zeigt jedoch, dass das Signal der TLMcapsid+mSA_preS1/2 Gruppe im Mittel um das 1000-fache niedriger als das der Kontrollen liegt (**Abbildung 35 b**). Damit wurde bei dieser Gruppe in etwa die gleiche Signalintensität ermittelt wie bei untransfizierten Hepatozyten. Der Effekt einer spezifischen Aktivierung der T-Zellen nach oraler Vakzinierung wird ebenso bei der Produktion von IFN γ verdeutlicht (**Abbildung 35 c**). Hier kommt es ausschließlich zu einer erhöhten IFN γ -Sekretion, wenn die T-Zellen aus Mäusen stammen, welche mit beladenen TLMcapsiden immunisiert wurden. Und auch dann nur, wenn diese T-Zellen in Kontakt mit HBV-positiven Zielzellen kommen.

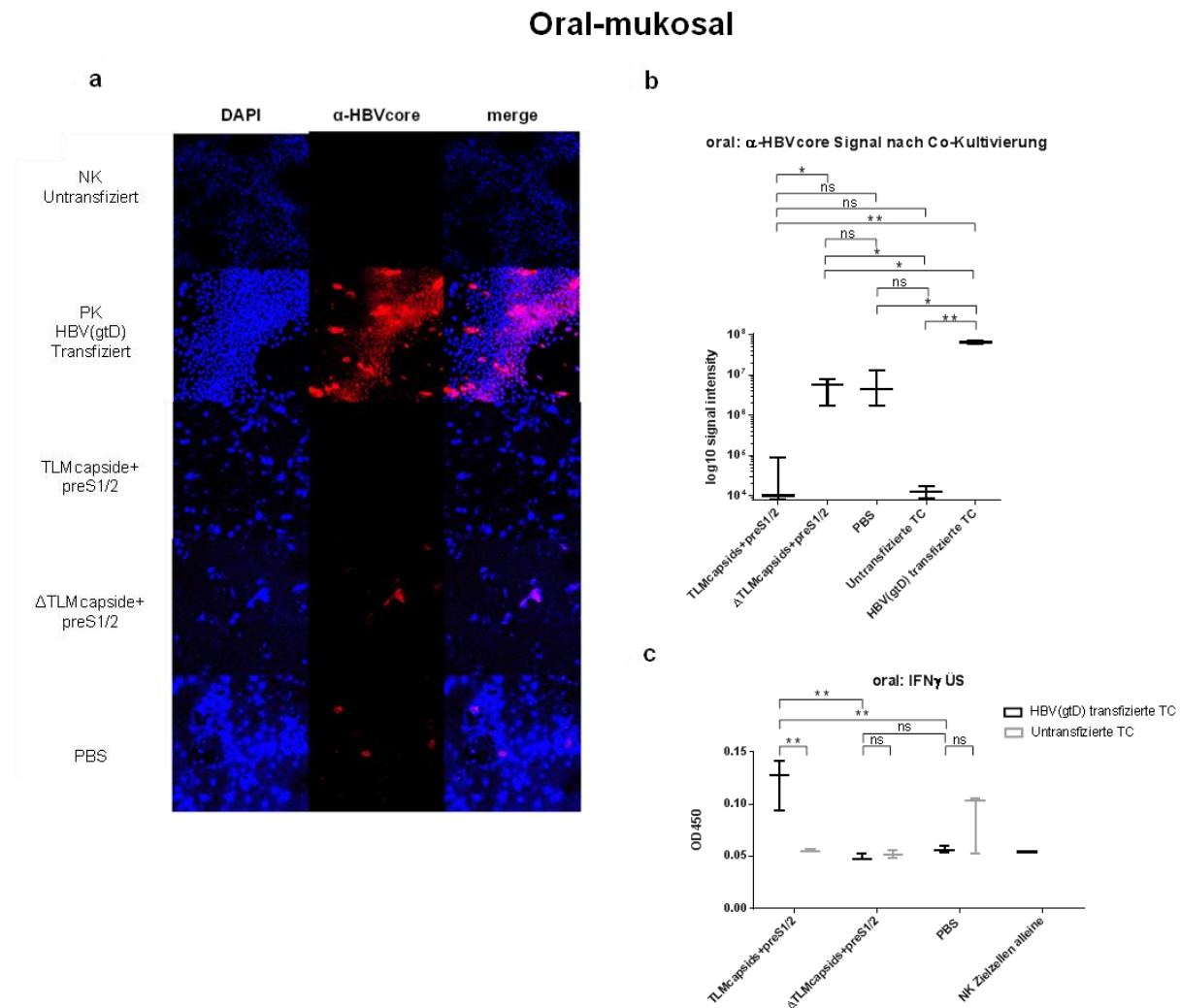


Abbildung 35: Oral-mukosale Immunisierung: Lyse von HBV-positiven AML12 Zellen nach Co-Kultivierung mit Splenozyten immunisierter Mäuse. C57/BL6N Mäuse wurden mit TLMcapsiden+mSA_preS1/2 und Kontrollen über die oral-mukosale Route immunisiert und die Splenozyten für 24 h mit HBV gtD-transfizierten murinen AML12 co-kultiviert. Das EC:TC Verhältnis betrug 1:10. **(a)** Die Menge an verbliebenen HBV-positiven Zielzellen nach 24 h wurde mittels HBVcore-spezifischem Antiserum (rot) und indirekter Immunfluoreszenzfärbung bestimmt. Nuklei wurden mit DAPI (blau) angefärbt. **(b)** Die HBVcore-spezifische Signalintensität aus (a) wurde mittels der Zeiss ZEN Software berechnet. **(c)** Die Menge an IFN γ im Überstand nach Co-Kultivierung mit HBV gtD-transfizierten und untransfizierten AML12 wurde mittels ELISA bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgte durch Anwendung von *one-way ANOVA*. ns = nicht signifikant; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

Neben der zellulären Immunantwort nach oral-mukosaler Immunisierung wurde auch die Antwort nach Pflaster-vermittelter, transdermaler Applikation analysiert. Hier wurde nach demselben Prinzip wie bei der oral-mukosalen Immunisierung vorgegangen, mit dem Unterschied, dass die Lymphozyten entnommen und analysiert wurden. Als zusätzliche Kontrolle wurde hierbei neben den Lymphozyten der Δ TLMcapsiden+mSA_preS1/2-Gruppe

auch die mSA_preS1/2-Gruppe verwendet. Eine Maus der TLMcapside+mSA_preS1/2-Gruppe zeigte eine deutliche humorale Immunantwort in Form eines starken anti-mSA_preS1/2 Antikörpersignals (**Abbildung 31**). Die Verwendung der Lymphozyten in Co-Kultur mit den HBV-positiven AML12 führte auch auf zellulärer Ebene zu einer erhöhten Abnahme des HBVcore-Signals und damit zu einem effizienteren Töten der Zielzellen (**Abbildung 36 a**). Die Verwendung von Lymphozyten der Vergleichsgruppen zeigen hierbei untereinander keinerlei Unterschiede und auch die bloße Anwesenheit von Lymphozyten in der AML12-Kultur hatte keine Auswirkungen auf die Zielzellen. Der visuelle Eindruck konnte auch durch Quantifizierung der HBVcore-Signalintensität bestätigt werden (**Abbildung 36 b**). Die Intensität von HBVcore ist in den Zielzellen der TLMcapside+mSA_preS1/2-Gruppe etwa um das 10-fache niedriger als in allen Kontrollgruppen. Dass es zu einer spezifischen Reaktivierung der zytotoxischen T-Lymphozyten gekommen ist, untermauern die Ergebnisse des sekretierten IFN γ im Überstand der Co-Kultur nach 24 h (**Abbildung 36 c**). Zwar zeigten alle Gruppen nach Kontakt mit den HBV-positiven Zielzellen einen erhöhten IFN γ -Spiegel im Vergleich zum Kontakt zu HBV-negativen Zellen, die deutlichste Änderung wurde allerdings bei der TLMcapside+mSA_preS1/2-Gruppe beobachtet. Der Vergleich der IFN γ -Level der einzelnen Gruppen nach Exposition mit den HBV-transfizierten Zellen ergab, dass etwa die doppelte Menge an IFN γ von den Lymphozyten der TLMcapside+mSA_preS1/2-immunisierten Mäuse ausgeschüttet wurde.

Die Ergebnisse der zellulären Immunantwort nach oral-mukosaler und transdermaler Immunisierung bestätigen die Ergebnisse der Untersuchungen zur humoralen Immunantwort. Ausschließlich die Lymphozyten und Splenozyten der mit beladenen TLMcapsiden immunisierten Mäuse wiesen ein Töten von HBV-positiven Zielzellen auf, welches mit einem erhöhten IFN γ -Level einherging.

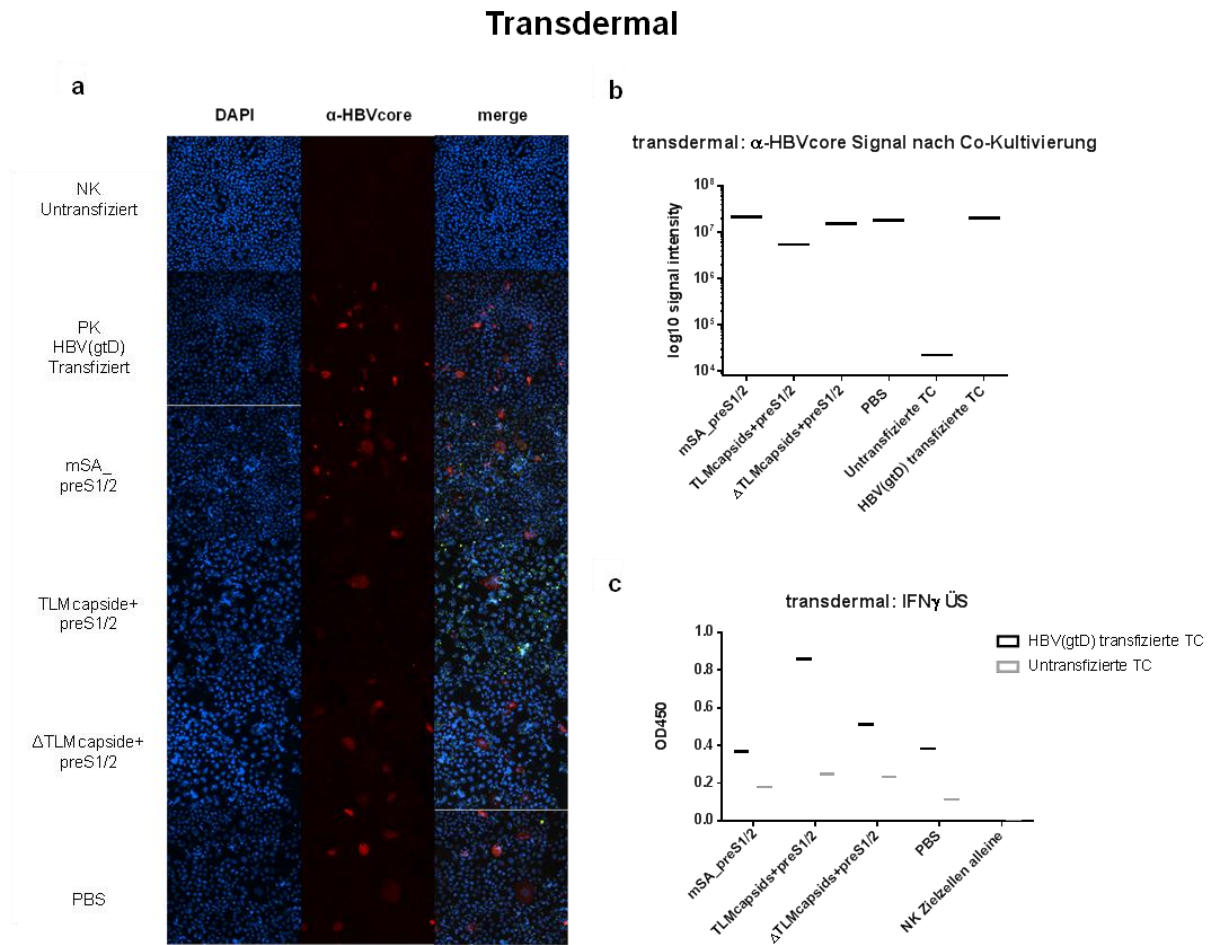


Abbildung 36: Transdermale Immunisierung: Lyse von HBV-positiven AML12 Zellen nach Co-Kultivierung mit Lymphozyten immunisierter Mäuse. C57/BL6N Mäuse wurden mit TLMcapsiden+mSA_preS1/2 und Kontrollen über die Pflaster-vermittelte transdermale Route immunisiert und die Lymphozyten für 24 h mit HBV gtD-transfizierten murinen AML12 co-kultiviert. Das EC:TC Verhältnis betrug 1:10. **(a)** Die Menge an verbliebenen HBV-positiven Zielzellen nach 24 h wurde mittels HBVcore-spezifischem Antiserum (rot) und indirekter Immunfluoreszenzfärbung bestimmt. Nuklei wurden mit DAPI (blau) angefärbt. **(b)** Die HBVcore-spezifische Signalintensität aus (a) wurde mittels der Zeiss ZEN Software berechnet. **(c)** Die Menge an IFN γ im Überstand nach Co-Kultivierung mit HBV gtD-transfizierten und untransfizierten AML12 wurde mittels ELISA bestimmt.

Zusammenfassend deuten die Untersuchungen zu den alternativen Routen oral-mukosal und transdermal darauf hin, dass die Verwendung von zellpermeablen TLMcapsiden zu einer Aufnahme über Hautschichten und Schleimhäute führt, welche schließlich in einer humoralen Immunantwort mit neutralisierenden Antikörpern, wie auch in der Aktivierung HBV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen mündet. Diese Erkenntnisse ebnen möglicherweise den Weg für neue nicht-invasive und nadelfreie Immunisierungsrouten, welche auf der Verabreichung über Pflaster oder über die Mundschleimhäute basierend könnten.

5 Diskussion

Die therapeutische Vakzinierung stellt eine der vielversprechendsten Strategien für die Behandlung einer chronischen Hepatitis-B-Virus-Infektion und somit auch gegen das HBV-induzierte hepatozelluläre Karzinom dar. Aktuell wird eine chronische HBV-Infektion mit (PEGyliertem) Interferon- α (IFN α) oder Nukleosid- und Nukleotidanaloga behandelt, welche das Ziel haben, die Replikation des Virus zu unterdrücken. Eines der Hauptprobleme bei einer chronischen Infektion besteht aber in der Persistenz von HBV in Hepatozyten in Form von episomaler cccDNA (*covalently closed circular DNA*, kovalent geschlossene zirkuläre DNA), integrierter DNA und einer ungenügenden zellulären Immunantwort [143]. Obwohl es eine Reihe von Ansätzen in präklinischen sowie klinischen Studien gibt [185–189], konnte bis heute kein Kandidat und keine Kombinationstherapie gefunden werden, welche eine chronische Hepatitis B heilen kann. Der Grund dafür liegt darin, dass ein therapeutisches Vakzin oder eine Kombinationstherapie sowohl eine B-Zellantwort mit neutralisierenden Antikörpern zur Reduktion der Virämie, als auch eine robuste CD8⁺ T-Zellantwort zur Eliminierung infizierter Zellen induzieren muss. Zusätzlich muss eine eventuell vorliegende Erschöpfung von HBV-spezifischen T-Zellen entweder aufgehoben werden oder es muss ein *de novo Priming* naiver T-Zellen stattfinden [186]. Die chronische Hepatitis B geht daher mit einer permanenten Entzündung der Leber einher, welche durch eine ungenügende Immunantwort bedingt ist, die nur zu einer teilweisen Eliminierung infizierter Hepatozyten führt. Die infizierten, aber nicht degranulierten Hepatozyten verbleiben und infizieren wieder neue Zellen, die im Zuge der Leberregeneration entstehen. Dies führt zu einem Kreislauf aus Zerstörung und Regenerierung, welcher dann zu einer Fibrose führt und schließlich in einer Zirrhose münden kann [123,124]. Ein kritischer Faktor für das Ausbleiben einer ausreichenden zytotoxischen Immunantwort ist die Menge an dysfunktionalen dendritischen Zellen (*dendritic cells*, DCs), welche im Zuge einer chronischen Hepatitis B entstehen. HBV inhibiert die Reifung von DCs, indem es die Expression von TLR-9 herunterreguliert und damit die Produktion von IL-6 und IFN α einschränkt [137–139]. Diese Unterfunktion von DCs beeinflusst wiederum die Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Aus diesem Grund könnte die Verbesserung der Antigenaufnahme, Prozessierung und Präsentation der Peptide auf MHC-I/II durch Antigen-präsentierende Zellen eine wichtige Strategie zur Steigerung der Zahl funktionaler HBV-spezifischer T-Zellen [271–273].

VLPs, welche mit Antigenen auf ihrer Oberfläche dekoriert sind, sind bekannt dafür, eine starke humorale Immunantwort gegen das gebundene Antigen auf Grund der extrem geordneten und dichten Präsentation zu induzieren [274,275]. Es gab bereits verschiedene Ansätze, in denen HBcAg-basierten VLPs Antigene im *Spike* eingefügt wurden. Diese chimären VLPs zeigten eine hohe Immunogenität [230,276]. In einem vorangegangenen

Projekt wurden VLPs auf Basis des HBcAg von HBV generiert, welche mit dem Permeabilität-vermittelnden *translocation motif* (TLM) fusioniert wurden und über ein Strep-tagIII im *Spike* der assemblierten Capside mit Streptavidin-fusionierten Antigenen beladen werden können. Es wurde beobachtet, dass die Beladung dieser TLMcapside mit OVA, fusioniert mit tetramerem Streptavidin, eine verbesserte *in vitro* Aktivierung von APCs zur Folge hat [61].

5.1 Herstellung von mSA_preS1/2-beladenen TLMcapsiden

Das Prinzip der Antigenkopplung auf TLMcapside zur Induktion einer verbesserten Immunantwort wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf die Behandlung von HBV-Infektionen mit Fokus auf eine therapeutische Vakzinierung gegen chronische Hepatitis B angewandt. Dazu wurden die Domänen PreS1 und PreS2 des HBV als Zielantigene mit monomerem Streptavidin fusioniert. Hierbei erlaubt die Verwendung eines monomeren Streptavidins eine definierte Bindung zum Strep-tagIII der Capside. Zusätzlich reduziert es sterische Probleme, wie sie bei Verwendung eines tetrameren Streptavidins aufkommen. Dadurch kann eine direkte Analyse mittels etablierter Modelle durch SPR-Spektroskopie durchgeführt werden. Neben PreS1, welches die Rezeptorbindedomäne von HBV, die essentiell für eine Infektion ist, beinhaltet [46,277] und PreS1PreS2, welches MHC-restringierte Peptide aufweist, die für eine zytotoxische CTL-Antwort erforderlich sind [265,264], wurde die S-Domäne auf Grund ihrer Transmembranregionen nicht miteingefügt (**Abbildung 15**) [31]. Dies sollte im Prozess der Proteinproduktion und späteren Reinigung den Vorteil einer höheren Proteinmenge in der löslichen Fraktion haben. Die Aufbereitung der Proteinelösung mittels nativer Ni-NTA Affinitätschromatografie wies jedoch, trotz ausreichender Menge an mSA_preS1/2, Kontaminationen mit Wirtsproteinen auf Grund der wenig spezifischen Bindung des Ni²⁺ zu mehrfachen Histidinen auf. Aus diesem Grund wurden für die Reinigung ausschließlich unlösliche *Inclusion Bodies* verwendet. Dies führte zu einem aufwendigeren Aufbereitungsverfahren, aber insgesamt zu größeren und reineren Mengen an mSA_preS1/2 in nativer Konformation (**Abbildung 16**).

Die verwendeten TLMcapside besitzen ein Tandem-TLM-Peptid am N-Terminus, was in einer verbesserten Permeabilität im Vergleich zu einem einzelnen TLM resultiert [86]. Zudem besitzen sie einen Strep-tagIII in der *Spike* Region zur Kopplung von Streptavidin-Fusionsproteinen (**Abbildung 17**). Bei vollständig assemblierten Capsiden bedeutet dies je nach Triangulationssymmetrie eine Präsentation von 180 oder 240 Strep-tagIII und damit eine maximale Anzahl von 180 oder 240 Molekülen mSA_preS1/2 pro TLMcapsid bei vollständiger Sättigung und ohne gegenseitige sterische Hinderung der Antigene. Die Untereinheiten der TLMcapside, die TLMcore-Proteine, konnten mittels Streptactin-

Affinitätschromatografie in hoher Reinheit aufbereitet werden (**Abbildung 18**). Einzig das schwache Signal einer Bande auf Höhe von etwa 70 kDa spricht für eine geringfügige Kontamination mit Wirtsproteinen. Hierbei handelt es sich vermutlich um das Chaperon Hsp70 (*Heat shock protein 70*) [278]. Die Intensität der Hsp70-Bande im SDS-Gel ist im Vergleich zu jener der TLMcore-Proteine vernachlässigbar klein. Gleiches gilt auch für die Reinigung der Kontrollcapside (Δ TLMcapside). Während Δ TLMcore-Proteine zu Δ TLMcapsiden autoassemblieren, mussten die TLMcapside mittels Erhöhung der Ionenstärke *in vitro* assembliert werden. Wie elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen (**Abbildung 19**) resultierte dies teilweise in unvollständig assemblierten TLMcapsiden. Der Grund für die ausbleibende Autoassemblierung könnte die Anwesenheit des TLM sein – obwohl hier jedoch erwähnt werden muss, dass assemblierte TLMcapside bereits erfolgreich in *E. coli* produziert werden konnten [86]. Darum könnte die Verwendung und Art des *Linkers* zwischen TLM und Core eine kritische Rolle in der Assemblierung der Capside spielen.

Für die Oberflächenorientierung des Strep-tagIII der Capside sowie für die native Konformation von mSA_preS1/2 spricht der erfolgreiche Nachweis der Bindung zwischen beiden Komponenten (**Abbildung 20**). Nach Inkubation der Capside mit mSA_preS1/2 ist ein deutlicher Zuwachs des Durchmessers erkennbar, der auf die Bindung des Antigens zurückzuführen ist. Auch der Signalversatz von freiem und auf Capsiden beladenem mSA_preS1/2 in verschiedenen Sucroседichten nach Zentrifugation weist auf eine Bindung und damit auf eine Co-Migration der Antigene mit den Capsiden durch die verschiedenen Dichten hin. Zu beachten ist hierbei, dass sich die teilweise Assemblierung der TLMcapside auch im Western Blot in Form von kleineren Agglomeraten bis hin zu TLMcore-Multimeren oder –Monomeren als HBVcore-Signal niederschlägt (**Abbildung 20 b**). Diese unvollständigen Capside zeigen ein Signal in den Fraktionen niedriger Dichte, welche zu gering für assemblierte Capside ist. Um indirekt eine Aussage über die Affinität und die Stärke der Bindung zwischen den Trägercapsiden und mSA_preS1/2 zu ermitteln, wurde das Antigen auf einen CM5-Chip immobilisiert und über Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie die Bindung zu TLMcapsiden und Δ TLMcapsiden untersucht. Dabei wurden die Capside in verschiedenen Molaritäten auf den Chip mit immobilisiertem Antigen gegeben und die Dissoziationskonstante K_D berechnet. Die Bindung zwischen mSA_preS1/2 und TLMcapsiden ergab eine K_D von $1,6 \cdot 10^{-7}$ M und zwischen mSA_preS1/2 und Δ TLMcapsiden von $3,5 \cdot 10^{-7}$ M (**Abbildung 21**). Diese Ergebnisse decken sich mit den Erkenntnissen aus früheren Studien, bei denen für die Bindung zwischen tetramerem Streptavidin-OVA und Strep-tagIII eine K_D von $9,57 \cdot 10^{-7}$ M und zwischen tetramerem Streptavidin und Strep-tagIII eine K_D von $1,06 \cdot 10^{-7}$ M errechnet wurde [61]. Aufgrund der Verwendung eines Strep-tagIII (zweimal Strep-tagII) liegt die K_D zwischen Antigen und den Strep-tagIII-fusionierten Capsiden niedriger als zwischen

Streptavidin und Strep-tagII ($K_D=1,3 \cdot 10^{-5}$ M). Dies deutet damit auf eine höhere Affinität und höhere Bindungsstärke zwischen Streptavidin und Strep-tagIII im Vergleich zu Strep-tagII hin. Die Verwendung des monomeren Streptavidins bringt damit den Vorteil geringerer sterischer Hinderung bei gleicher Affinität zu Strep-tagIII im Vergleich zu tetramerem Streptavidin. Die Fusion von mSA an Antigene und Strep-tagIII an Capside bietet damit die beste Voraussetzung für eine stabile Bindung und vollständige Beladung der Antigene auf die Oberfläche der Trägercapside.

5.2 TLMcapside diffundieren durch Zellmembranen und Gewebeschichten

Um zu überprüfen, ob nach Assemblierung und späterer Kopplung der TLMcapside mit mSA_preS1/2 eine Diffusion durch Gewebe und Membranen auf Grund der durch TLM vermittelten Zellpermeabilität stattfindet, wurden sowohl *in vivo* als auch *ex vivo* Experimente durchgeführt. Es konnte in früheren Studien bereits beobachtet werden, dass TLMcapside in der Lage sind, gekoppeltes tetrameres Streptavidin-OVA durch die Zellmembran und ins Zytoplasma zu transportieren [61]. Der TLM-vermittelte Transport ist dabei prinzipiell unabhängig vom Zelltyp und von Rezeptorbindungen [48]. Da das transportierte Antigen, welches in dieser Arbeit verwendet wurde, allerdings PreS1 und PreS2 beinhaltet, musste geprüft werden, ob ein Antigen mit diesen speziellen Domänen die TLM-vermittelte Zellpermeabilität beeinflusst. PreS2 selbst, und damit auch mSA_preS1/2, beinhaltet ebenfalls das TLM-Peptid. Dies bedeutet, dass das Antigen, welches über einen zellpermeablen Träger ins Zytoplasma transportiert werden soll, potentiell selbst bereits zellpermeabel sein könnte und die durch das TLMcapsid vermeintlich hervorgerufenen Effekte auf das Antigen selbst zurückgeführt werden könnten. Aus diesem Grund wurde die Permeabilität auch mit Antigen ohne TLMcapsid sowie gebunden an Capside ohne TLM (Δ TLMcapside) getestet (**Abbildung 22**). Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass mSA_preS1/2 alleine zwar auf Grund des Antigen-eigenen TLM ins Zytoplasma diffundieren kann, der Transport aber um ein Vielfaches effektiver ist, wenn das Antigen über zellpermeable TLMcapside transportiert wird. Auf der anderen Seite führt das TLM innerhalb des PreS2 von mSA_preS1/2 nicht zu einer Permeabilität, wenn es an impermeable Δ TLMcapside gekoppelt wird. Grund dafür könnte einerseits sein, dass die Fusion von monomerem Streptavidin an PreS1PreS2 die Dimerisierung von PreS1PreS2 verhindert, welche erforderlich für die Permeabilität ist oder dass die Fusion eines Tandem-TLM am TLMcapsid dem monomeren TLM in der PreS2-Domäne überlegen ist [61,86]. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass die beobachtete Migration von TLMcapsid+mSA_preS1/2 ins Zytoplasma nicht auf die Beihilfe des Antigens, sondern allein

auf das zellpermeable Trägercapsid zurückzuführen ist. Da sowohl unbeladene als auch beladene TLMcapside ähnliche intrazelluläre Signale zeigen, kann zusätzlich geschlussfolgert werden, dass das Antigen bei einer Beladung der Capside die präsentierten TLM-Peptide weder maskiert noch funktionell einschränkt.

Wie in den *in-vivo-Imaging* Experimenten zur Biodistribution (**Abbildung 23**) beobachtet, können TLMcapside, beladen oder alleine, nicht nur durch einzelne Zellen, sondern durch den gesamten Organismus eines lebendigen Tieres diffundieren und sich dort in unterschiedlichen Geweben und Organen verteilen. Im Unterschied zu impermeablen Δ TLMcapsiden scheint ihre Distribution physikalisch nicht auf Grund ihrer Größe limitiert zu sein. Sie scheinen sogar dem Fick'schen Gesetz der Diffusion mit Diffusionskoeffizienten von Objekten zu folgen, welche um ein Vielfaches kleiner sind, wie mSA_preS1/2 – mit dem Unterschied, dass die Distribution von TLMcapsiden wesentlich länger detektierbar ist als die von Δ TLMcapsiden oder Antigen. Während der ersten 30 min nach Injektion hat es zunächst den Anschein, dass die sichtbare Menge an injiziertem Protein innerhalb des Peritoneums zwischen den einzelnen Proben stark variiert. Hierbei ist zu beachten, dass dies weder auf Grund verschiedener Mengen injizierten Proteins noch aufgrund verschiedener Markierungseffizienzen durch die Cy7-Kopplung hervorgerufen wird. Der Grund liegt in den unterschiedlichen Tiefen, in denen das Protein nach Injektion im Bauchraum vorliegt. Da die Detektion von Cy7-markierten Proteinen umso schwieriger wird, je tiefer das zu detektierende Protein ausgehend von der Körperoberfläche, welche in Richtung Detektor gerichtet ist, lokalisiert ist, emittieren weiter entfernte Proteine geringere Signale. Diese Proteinkonzentrationsgradienten und unterschiedlichen Tiefen äquilibrieren sich nach etwa 30 min. Ab diesem Zeitpunkt herrschen für alle injizierten Proben dieselben Ausgangsbedingungen. Der Weg der Verteilung der impermeablen Δ TLMcapside, ob Antigen-gekoppelt oder nicht, beschränkt sich im Gegensatz zu den permeablen TLMcapsiden hauptsächlich auf die Blutgefäße. Nach der Akkumulierung im Peritoneum scheinen die Δ TLMcapside den Blutkreislauf über die abdominale Aorta zu betreten. Von dort aus verbreiten sie sich in Richtung des Schwanzes über die Caudalarterien, in die Extremitäten über die Femoralarterien (Oberschenkelarterien) und axillären Arterien und erreichen Kopf und Nacken über die Carotis (Halsschlagader). Ob Antigene und TLMcapside sich ebenfalls über den Blutkreislauf verteilen oder direkt aus dem Peritonealraum diffundieren, ist nicht vollständig ersichtlich. Eine Blutentnahme und nachfolgende Untersuchung durch Fluoreszenzmessung auf Capside und Antigen im Blut der Tiere, hätte hier eventuell zur Klärung der Distributionsroute geführt.

Wie bereits erwähnt ist die Verwendung von mSA_preS1/2 als Antigen nicht nur auf Grund des TLM in PreS2 speziell, sondern wurde vor allem auch wegen der viralen Rezeptorbindedomäne in PreS1 [46,277] gewählt. Damit besteht jedoch die potentielle

Möglichkeit einer Bindung zwischen PreS1 in mSA_preS1/2 und NTCP auf der Oberfläche von Hepatozyten. Aus den Daten des *in-vivo-Imagings* ist ersichtlich, dass mSA_preS1/2, gebunden an Capside oder alleine, keine sichtbare Tendenz aufweist, sich vermehrt in der Leber zu akkumulieren. Um das Verhalten der beladenen Capside innerhalb der Leber genauer untersuchen zu können, wurde Mäusen mSA_preS1/2-beladene TLMcapside und Δ TLMcapside I.P. injiziert und deren Verteilung in der Leber analysiert (**Abbildung 24**). Ähnlich den Ergebnissen des *in vitro* Permeabilitätsassays (**Abbildung 22**) diffundieren die TLMcapside auch innerhalb der Leber ins Zytoplasma der einzelnen Zellen, während die impermeablen Δ TLMcapside hauptsächlich an der Plasmamembran lokalisiert sind. Bereits im Jahr 2000 konnte beobachtet werden, dass PreS2-TLM, injiziert über die Pfortader von Mäusen, durch das Lebergewebe diffundiert und sich dort gleichmäßig verteilt [48]. Ob die Plasmamembranlokalisation der beladenen Δ TLMcapside tatsächlich auf eine Bindung von PreS1 an NTCP zurückgeht, ist unklar. Studien ergaben zwar, dass das PreS1 des LHBs von HBV an mNTCP (Maus-NTCP) in der Leber binden kann, dass dies aber nur im Falle einer Myristoylierung des N-terminalen Glycins von PreS1 möglich ist. Ohne Lipidanteil wurde PreS1 in dieser Studie über renale Filtration ausgeschieden [279]. Da *E. coli*, der bakterielle Produktionswirt von mSA_preS1/2, keine endogene N-Myristoyltransferaseaktivität besitzt, kann die Myristoylierung von PreS1 als Grund für die Membranlokalisation ausgeschlossen werden [280]. Daneben ist bekannt, dass ein *antigenic loop* (AGL) in der S-Domäne der HBV-Oberflächenproteine für die Anlagerung an Heparansulfatproteoglykane (HSPG) der Hepatozyten verantwortlich ist [281]. Da die S-Domäne jedoch in mSA_preS1/2 nicht enthalten ist, kann auch diese Anlagerung ausgeschlossen werden. Möglicherweise repräsentiert **Abbildung 24** daher nur einen Zeitpunkt, in dem mSA_preS1/2+ Δ TLMcapside den Interzellularraum passieren.

5.3 Verbesserte humorale Immunantwort nach Vakzinierung mit beladenen TLMcapsiden

Da die Biodistribution, wie in **Abbildung 23** beobachtet, durch die Verwendung des TLM-Peptids in Capsiden maßgeblich beeinflusst wird, wurde überprüft, ob sich diese verlängerte Retention durch eine eventuell veränderte Interaktion mit APCs in unterschiedlichen humoralen Immunantworten widerspiegelt. In **Abbildung 25** ist die signifikante Erhöhung der mSA_preS1/2-spezifischen Antikörper nach Immunisierung der Mäuse mit TLMcapsiden im Vergleich zu Δ TLMcapsiden dargestellt. Diese Erhöhung des Antikörperspiegels nach Gebrauch von zellpermeablen Capsiden erscheint zunächst widersprüchlich. Da die Produktion von Antikörpern durch Plasmazellen von der Antwort spezifischer CD4⁺ T-Zellen abhängig ist, sollte sie bei Verwendung von impermeablen Capsiden effizienter sein. Wenn

beladene TLMcapside durch Diffusion ins Zytoplasma von APCs gelangen und dort immunoproteasomal prozessiert werden, sollten sie wie ein intrazelluläres Antigen über MHC-I Moleküle präsentiert werden. In der Folge müssten die Peptide der Capside und beladenen Antigene über MHC-I eine CD8⁺ CTL Antwort stimulieren. Beladene Δ TLMcapside sollten hingegen über Makropinozytose aufgenommen und die prozessierten Peptide – wie für extrazelluläre Antigene üblich – vor allem über MHC-II präsentiert werden, was in einer nachfolgenden Aktivierung von spezifischen CD4⁺ T-Zellen und einer stärker ausgeprägten B-Zellantwort mündet. Jedoch wurde das genaue Gegenteil beobachtet. Studien ergaben dazu, dass intrazelluläre, neosynthetisierte Antigene des Masern- und des Influenzavirus ebenfalls MHC-II-abhängig CD4⁺ T-Zellen präsentiert werden, statt lediglich über MHC-I [282,283]. Diese umgekehrte *cross-presentation* wird vermutlich über den Autophagie-Weg induziert. Autophagie kann nicht nur eine Rolle bei der Präsentation über MHC-I spielen, wie es für HSV-I und CMV beobachtet wurde [284,285], sondern scheint ebenso bei der MHC-II-abhängigen Präsentation endogener Antigene involviert zu sein [286–288]. Die Antigen-beladenen TLMcapside, welche über Diffusion ins Zytoplasma der APCs gelangen, werden somit nicht nur den CD8⁺ T-Zellen über MHC-I, sondern auch über den Weg der Autophagie auf MHC-II Moleküle geladen und den CD4⁺ T-Zellen präsentiert. Die verbesserte humorale Immunantwort könnte zusätzlich durch die ausgeprägte, systemische Biodistribution zellpermeabler Capside bedingt sein (**Abbildung 23**), welche zum Kontakt zu einer größeren Zahl APCs führt. Insgesamt mündet dies in einer stärkeren, humoralen Immunantwort bei Verwendung von TLMcapsiden im Vergleich zu Δ TLMcapsiden. Aus der Verwendung von freiem mSA_preS1/2 resultierte insgesamt ein niedrigeres Level an spezifischen Antikörpern im Vergleich zur Verwendung von mSA_preS1/2 gebunden an Trägercapside. Dies beruht auf einer entscheidenden Eigenschaft von VLPs. Durch die Präsentation der Antigene in hoher Zahl und Dichte auf den globulären Capsiden kommt es zu einer Vernetzung (*cross-linking*) der B-Zellrezeptoren auf den B-Zellen und in der Folge zu einer stärker ausgeprägten humoralen Antwort im Vergleich zur Verwendung von freiem Antigen [289]. Die signifikanten Unterschiede in der Menge an spezifischen Antikörpern gegen das Antigen führen allerdings nicht zu unterschiedlich starkem Blocken der HBV-Infektion *in vitro* (**Abbildung 27 e**) bei einer Serumverdünnung von 1:20. Die Verwendung von Serum nach I.P.-Injektion von mSA_preS1/2, ob frei oder gebunden an VLPs, führt in jedem Fall zu einer drastischen Reduktion der Infektionseffizienz. Der Grund dafür liegt in der Bindung der Antikörper an dieselbe Domäne innerhalb des PreS1, welche als Rezeptorbindedomäne bekannt und für eine Infektion essentiell ist (**Abbildung 26**). Geringe Unterschiede sind lediglich bei einer Serumverdünnung von 1:50 - 1:500 der mSA_preS1/2+ Δ TLMcapsid-Gruppe im Vergleich zu den Gruppen der mSA_preS1/2+TLMcapside und freiem mSA_preS1/2 zu erkennen. Dabei

liegt der s/cut-off-Wert für die Gruppe mit beladenen Δ TLMcapsiden etwas höher als für die der beladenen TLMcapside und freiem mSA_preS1/2, was für eine etwas niedrigere Menge neutralisierender Antikörper sprechen könnte (**Abbildung 27 a-d**). Laut den Ergebnissen des mSA_preS1/2-Peptidarrays (**Abbildung 26**) binden die Antikörper der Mausseren etwa den Bereich von AS 21 – AS 47 der PreS1-Domäne. Antikörper, welche an diese Region binden wie 4D11, 7H11 oder MA18/7, sind bekannt dafür, eine Infektion mit HBV zu neutralisieren [260,290,45,291]. Auch die Region um das TLM im Bereich AS 33 – AS 52 des PreS2 ist ein potentiell Antikörperepitop [292,293], obwohl diese im Falle der Verwendung von mSA_preS1/2 keine deutlichen Signale im Peptidarray hervorruft und keine protektiven Eigenschaften besitzt. Das ausbleibende Signal könnte auf ein konformationsabhängiges Epitop zurückzuführen sein, welches deshalb im Array nicht erkannt wird. Es gibt Beweise dafür, dass eine effiziente B-Zellantwort mitentscheidend für die Kontrolle einer chronischen HBV-Infektion ist. Patienten mit B-Zell-Lymphom können mit Rituximab behandelt werden, welches die Zahl an B-Zellen verringert. Sind diese Patienten zur gleichen Zeit chronisch mit HBV infiziert und werden mit Rituximab behandelt, so kann es zu einer Reaktivierung von HBV kommen. Dies spricht deutlich für die Relevanz einer ausreichenden B-Zellantwort bei chronischer HBV-Infektion [294,295]. Die Induktion spezifischer Antikörper durch Verwendung von mSA_preS1/2, welche die Rezeptorbindedomäne von HBV maskieren, kann die Ausbreitung und Neuinfektion von nicht infizierten Zellen verhindern [296,297].

5.4 Verbesserte zelluläre Immunantwort nach Vakzinierung mit beladenen TLMcapsiden

Während die Induktion von protektiven Antikörpern das wesentliche Ziel einer präventiven Vakzinierung darstellt, verlangt eine wirksame, therapeutische Vakzinierung zusätzlich die Stimulation einer starken, zellulären Immunantwort. Allein durch die Reduktion der Virämie durch eine humorale Antwort, aber ohne eine ausreichende Eliminierung von infizierten Zellen durch spezifische, zytotoxische T-Lymphozyten, kann eine chronische HBV-Infektion nicht beseitigt werden. Aus diesem Grund wurden die Lymphozyten der I.P. vakzinieren Mäuse auf ihr Vermögen der Restimulation zur Identifizierung HBV-spezifischer Gedächtniszellen anhand der Marker Granzym A und CD107a sowie auf ihre spezifische Zytotoxizität in Co-Kultur mit HBV-exprimierenden Zielzellen getestet. In **Abbildung 28 a** ist zu erkennen, dass eine spezifische Stimulation erfolgt sein muss, da die Vakzinierungsgruppen einen deutlichen Unterschied zur OVA-Kontrolle und den unstimulierten Zellen zeigen. Gleichzeitig gibt es jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen mSA_preS1/2, TLMcapside+mSA_preS1/2 und Δ TLMcapside+mSA_preS1/2. Die Positivkontrolle PMA zeigt jedoch ebenfalls etwa

dieselben Werte wie die Vakzingruppen. Dies könnte bedeuten, dass die Vakzingruppen Mengen an Granzym A aufweisen, die bereits die Sättigung darstellen und deshalb keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen zu detektieren sind. Bei der Detektion von CD107a (**Abbildung 28 b**), bei welcher während der Kultivierung Brefeldin A verwendet wurde und die Ergebnisse deshalb reziprok zu jenen der Granzym A-Messung sind, zeigt sich ein deutlicher Anstieg der CD107a⁺ CD8⁺ T-Zellen nach Restimulation der TLMcapside+mSA_preS1/2-Gruppe, was für eine spezifische Freisetzung granulierender Proteine spricht. Die Gruppen mSA_preS1/2 sowie Δ TLMcapside+mSA_preS1/2 zeigen hingegen keine spezifische Restimulation. Einzig die Lymphozyten der TLMcapside+mSA_preS1/2 immunisierten Mäuse weisen HBV-spezifische CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen auf. Dies wird durch das Zytotoxizitätsassay bestätigt, bei denen die Lymphozyten der immunisierten Mäuse mit HBV-exprimierenden Maus-Hepatozyten co-kultiviert wurden (**Abbildung 29 a,b**). Der Vergleich der Gruppen zeigt eine analoge Repräsentation der B-Zellantwort (**Abbildung 25**). Komponenten, welche einen hohen Antikörpertiter in Mäusen induziert haben, sind auch in der Lage, größere Menge an spezifischen CTLs zu aktivieren und umgekehrt. Während im Serum der Mäuse der TLMcapside+mSA_preS1/2-Gruppe der höchste Antikörpertiter gemessen wurde, zeigen die Lymphozyten derselben Mäuse auch die größten zytotoxischen Effekte gegen die HBV-positiven Zielzellen. Auch wenn die Co-Kultivierung von Lymphozyten mit Zielzellen bereits leichte basale, zytotoxische Effekte hervorruft, wie in der PBS-Gruppe zu erkennen ist, demonstrieren die Ergebnisse eine starke HBV-spezifische Elimination auf Seiten der TLMcapside+mSA_preS1/2-Gruppe im Vergleich zu allen Kontrollen. Die Messung an sekretiertem IFN γ im Überstand der Co-Kultur als Aktivierungsmarker für CD8⁺ CTLs [298] deckt sich ebenso mit diesen Ergebnissen (**Abbildung 29 c**). Die Lymphozyten der TLMcapside+mSA_preS1/2-Gruppe weisen hierbei nicht nur die höchste spezifische Aktivierung zwischen HBV-transfizierten und untransfizierten Zellen auf, sondern sekretierten die größte Menge an IFN γ im Vergleich zu allen Kontrollgruppen. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Immunsierung mit zellpermeablen TLMcapsiden+mSA_preS1/2 nicht nur zu der am stärksten ausgeprägten humoralen Immunantwort führt, sondern auch zur effizientesten Aktivierung HBV-spezifischer T-Zellen im Vergleich zu impermeablen, beladenen Capsiden und freiem Antigen. Zusätzlich zur Elimination von HBV-positiven Hepatozyten durch spezifische CTLs könnte die erhöhte Menge an IFN γ zu einer Replikationshemmung des Virus im Falle einer Infektion führen [299].

5.5 Transdermale und orale Vakzinierung als alternative Routen basierend auf beladenen TLMcapsiden

Die Permeabilität der TLMcapside gilt für Gewebeschichten unterschiedlichster Größe. Wie in dieser Arbeit beobachtet werden konnte, schließt dies Zellen (**Abbildung 22**), Hautschichten (**Abbildung 30**) und Organe (**Abbildung 24**) ein und führt zu einer kompletten, systemischen Distribution im lebenden Tier (**Abbildung 23**). Die Tatsache, dass die Fusion der Capside mit TLM zu einer Migration durch die Hautschichten führt, offenbart interessante Möglichkeiten zur Vakzinierung über die klassische intramuskuläre Route hinaus. Es ist bekannt, dass es immunologisch förderlich sein kann, HBV-Vakzine intradermal zu verabreichen, da dies die Zahl an *Non-respondern* und *Low-respondern* im Vergleich zur intramuskulären Injektion senken kann [252,250,251]. Unabhängig davon, ob ein Impfstoff intra- oder transdermal verabreicht wird, zielt beides auf die Aufnahme durch Langerhans Zellen (LC) ab, welche sich innerhalb der Dermis befinden und in der Lage sind, hohe Mengen an MHC-II zu exprimieren. Bei LCs handelt es sich um potente APCs, welche von der Haut in die Lymphknoten wandern und die Peptide CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen präsentieren [300–303]. Darüber hinaus scheinen die Langerhans Zellen in der Lage zu sein, Antigene auf Dendritische Zellen (DC) in den Lymphknoten zu transferieren, um über LC-DC-Verbindung CD8⁺ T-Zellen zu rekrutieren [304]. Daher repräsentiert die Haut im Vergleich zum wenig immunopotenten Muskelgewebe ein vielversprechendes, immunologisches Zielorgan für Vakzinierungen [305,306]. Bei der intradermalen Vakzinierung muss die Überwindung der Hautbarriere über (Mikro-)Nadeln erfolgen, um letztlich das Antigen in Kontakt mit den APCs zu bringen [307]. Der in dieser Arbeit etablierte transdermale Ansatz beruht jedoch auf der Überwindung der Hautbarriere über Diffusion. Dass das Ansteuern von APCs in der Haut über ein einfaches Pflastersystem jedoch nicht mit allen Antigenen funktioniert, sondern in dieser Arbeit einzig durch zellpermeable Capside erreicht werden konnte, wurde in **Abbildung 30** und **Abbildung 31** demonstriert. Nur im Falle einer Immunisierung mit TLMcapsiden+mSA_preS1/2 über Transdermal-Pflaster kam es auch zu einer spezifischen B-Zellinduktion. Wie auch in **Abbildung 30** gezeigt wurde, ist die Migration der permeablen Capside durch die Hautschichten prinzipiell möglich. Jedoch erwies sich die Umsetzung der Pflaster-vermittelten Immunisierung der lebendigen Mäuse als schwierig. Es kann nicht sicher beantwortet werden, ob die geringe Immunisierungsrate im transdermalen Ansatz von der transdermalen Migration und der Induktion einer Immunantwort oder eher von der Handhabung des Pflastersystems im lebenden Tier herrührt. Die Tatsache, dass eine Maus eine *Boost*-abhängige Immunantwort zeigte und diese Maus mit permeablen TLMcapsiden+mSA_preS1/2 immunisiert wurde, zeugt davon,

dass die transdermale Immunisierung funktionieren kann – jedoch schwierig mit lebenden und agilen Mäusen umsetzbar ist.

Eine oral-mukosale Immunisierung, also eine Aufnahme des Vakzins über die Mundschleimhäute, stellt eine weitere alternative und nichtinvasive Route dar, die mit permeablen TLMcapsiden umgesetzt werden konnte. Ähnlich zum transdermalen Ansatz bilden Mäuse bei oral-mukosaler Gabe ausschließlich Antikörper, wenn mit zellpermeablen, beladenen TLMcapsiden vakziniert wurde (**Abbildung 32**). Da die Proben direkt ins Maul sedierter Mäuse pipettiert wurden, konnten sie für längere Zeit im Mundraum verbleiben. Dort führten sie zu einer Immunantwort im oral-mukosalen und sublingualen Gewebe und vermutlich teilweise im nasal-assoziierten lymphatischen Gewebe (NALT). Die TLMcapside diffundieren vermutlich durch *Microfold* Zellen (M-Zellen), welche sich zwischen Epithelzellen im mukosalen Gewebe befinden, im NALT oder durch M-Zell-ähnliche Zellen in den Gaumenmandeln zu den APCs [308–310]. Das transportierte mSA_preS1/2 wird schließlich von DCs aufgenommen oder von M-Zellen an DCs weitergegeben (Transzytose) [311]. Aktivierte DCs wandern anschließend in die interfollikale T-Zellzone und präsentieren die prozessierten Peptide den ansässigen T-Zellen [312]. Wie auch im Falle der Vakzinierung über die I.P. Route (**Abbildung 25** und **Abbildung 27**), war das Serum jeder Maus, welche erfolgreich über die transdermale oder oral-mukosale Route mit freiem oder gebundenem mSA_preS1/2 immunisiert werden konnte, in der Lage, eine HBV-Infektion *in vitro* zu blockieren (**Abbildung 34**). Auch wenn die orale Vakzinierung zu einer HBsAg-Abnahme und damit zu vermeintlicher Blockierung der Infektion aus Sicht der Statistik führt, so zeigt sich doch eine hohe Standardabweichung verglichen zur verwendeten intraperitonealen Route. Die Ergebnisse zur Zytotoxizität spezifischer T-Zellen nach oraler und transdermaler Vakzinierung entsprechen jenen der ermittelten B-Zellantwort (**Abbildung 35** und **Abbildung 36**). Die Lymphozyten (transdermal) und Splenozyten (oral-mukosal) jeder Maus, welche nach Immunisierung mit beladenen TLMcapsiden erfolgreich eine B-Zellantwort induzieren konnte, zeigen ebenfalls starke, zytotoxische Reaktionen und eine spezifische Eliminierung HBV-positiver Zellen. Wie auch in **Abbildung 29 c** weisen die T-Zellen nach oraler und transdermaler Vakzinierung mit zellpermeablen, beladenen Capsiden erhöhte IFN γ -Werte auf, welche für eine spezifische Aktivierung der Effektorzellen sprechen. Dies zeugt von der Potenz der zellpermeablen Trägercapside Antigen über die Schleimhäute und Hautschichten zu APCs zu transportieren und eine spezifische CD8⁺ CTL Antwort auszulösen.

Im direkten Vergleich der reinen Menge an mSA_preS1/2-spezifischen Antikörpern zwischen allen drei verwendeten Routen ergeben sich jedoch keine relevanten Unterschiede (**Abbildung 33**). Für die humorale Immunantwort ist somit keine der Routen den übrigen vorzuziehen, sondern alle sind auf gleiche Weise effizient. Der Vergleich der T-Zellantwort

nach Immunisierung mit beladenen TLMcapsiden zwischen den drei Routen kann nur in Zusammenhang mit dem jeweils verwendeten Bezugssystem geschehen, jedoch wurde hierbei die effizienteste Eliminierung bei der oral-mukosalen Vakzinierung beobachtet. Dies könnte auf die Anwesenheit der Splenozyten in der Co-Kultur zurückzuführen sein, während für die intraperitoneale und transdermale Vakzinierung Lymphozyten verwendet wurden. Die HBV-spezifische Aktivierung von T-Zellen in Form einer IFN γ -Sekretion unterscheidet sich hingegen zwischen den einzelnen Routen nicht. Dies bedeutet, dass die Gabe von beladenen TLMcapsiden über jede Route zu einer effizienten Induktion einer CTL-Antwort führt.

5.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Die erfassten Daten dieser Arbeit weisen zusammengefasst darauf hin, dass diese neuartige, zellpermeable Impfstoffplattform das Potential besitzt, eine starke humorale wie auch zelluläre Immunantwort zu induzieren. Dies könnte als Basis für eine therapeutische Vakzinierung gegen chronische HBV-Infektionen fungieren. Darüber hinaus kann die Zellpermeabilität der TLMcapside genutzt werden, um eine nadelfreie und nichtinvasive Immunisierung durch Antigen-Transfer über Zell- und Gewebeschichten hinweg durchzuführen. Die dadurch ermöglichte oral-mukosale und transdermale Vakzinierung könnte nicht nur zur Reduktion der Zahl an HBV-*Non-Respondern*, sondern auch zu einer insgesamt verbesserten *Compliance* von Patienten führen. Als nächster Schritt sollte zukünftig untersucht werden, wie sich die Immunisierung über die verschiedenen Routen mittels mSA_preS1/2-beladener TLMcapside auf eine HBV-Infektion *in vivo* auswirkt. Da es bis zum heutigen Tag kein Mausmodell für HBV-Infektionen gibt, welches für die Erforschung von Impfstoffen geeignet wäre [313], könnte das HBV-Genom alternativ als extrachromosomales *Template* über adenoviralen Transfer in die Lebern von Wildtyp-Mäusen eingebracht werden. Vor (prophylaktische Immunisierung) oder nach (therapeutische Immunisierung) dem adenoviralen Transfer würden die Mäuse über die I.P., oral-mukosale oder transdermale Route immunisiert. Durch nachfolgende Untersuchung der Anzahl HBV-positiver Hepatozyten könnte eine Aussage über die Wirksamkeit des Vakzins in Zusammenhang mit den verwendeten Routen als prophylaktischer und therapeutischer Impfstoff getroffen werden. Weiterhin könnte die Problematik der T-Zellerschöpfung dahingehend adressiert werden, dass Mäusen der adenovirale Vektor zur Infektion der Leber injiziert wird und vier Wochen später geprüft wird, ob die Anzahl an HBV-spezifischen, intrahepatischen T-Zellen des Phänotyps PD-1^{hi} CD127^{low} CD4⁺ und CD8⁺, welche somit als Marker für eine Erschöpfung dieser Zellen dient, zugenommen hat [314]. Durch nachfolgende Immunisierung mit TLMcapsiden+mSA_preS1/2 über die verschiedenen

Routen könnte dann wieder untersucht werden, ob sich die Zahl der T-Zellen dieses Phänotyps reduziert und es zu einem *de novo priming* HBV-spezifischer T-Zellen kommt. TLMcapside, als universelle Impfstoffplattformen, können neben den HBV-Antigenen selbstverständlich auch mit weiteren Antigenen beladen werden. Neben der Verwendung der Antigene des HCV oder auch des Influenzavirus, deren Impfstoffentwicklung nachwievor von großer Bedeutung ist, könnten die Capside auch mit Antigenen des neuartigen Coronavirus Sars-CoV-2 beladen werden. Als Zielantigen würde sich das *Spike*-Glykoprotein S bzw. lediglich dessen S1-Domäne anbieten, welche die Rezeptorbindedomäne (RBD) des Virus enthält und für den Zelleintritt mit dem ACE2-Rezeptor der Zielzelle interagiert [315]. Die Beladung des Antigens auf die zellpermeablen TLMcapside und nachfolgende intraperitoneale, oral-mukosale oder transdermale Immunsierung könnte, wie im Falle des Vakzins TLMcapside+mSA_preS1/2, sowohl eine ausgeprägte B-Zellantwort mit Produktion neutralisierender Antikörper als auch eine robuste T-Zellantwort gegen das SARS-CoV-2 induzieren. Eventuell birgt der Ansatz der zellpermeablen TLMcapside auch hier die Möglichkeit einer therapeutischen Behandlung an Covid-19 erkrankter Patienten.

6 Literatur

1. **Blumberg, B.S., Alter, H.J., Visnich, S.**, 1965. A "new" antigen in leukemia sera. *JAMA*. 191:541–546.
2. **Gerlich, W.H.**, 2013. Medical virology of hepatitis B: how it began and where we are now. *Virology journal*. 10:239.
3. **London, W.T., Sutnick, A.I., Blumberg, B.S.**, 1969. Australia antigen and acute viral hepatitis. *Annals of internal medicine*. 70:55–59.
4. **Blumberg, B.S.**, 2002. *Hepatitis B. The Hunt for a Killer Virus*. Princeton University Press. Princeton.
5. **Dane, D.S., Cameron, C.H., Briggs, M.**, 1970. VIRUS-LIKE PARTICLES IN SERUM OF PATIENTS WITH AUSTRALIA-ANTIGEN-ASSOCIATED HEPATITIS. *The Lancet*. 295:695–698.
6. **Schaefer, S.**, 2007. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World Journal of Gastroenterology : WJG*. 13:14–21.
7. **Drexler, J.F., Geipel, A., König, A., Corman, V.M., van Riel, D., Leijten, L.M., Bremer, C.M., Rasche, A., et al.**, 2013. Bats carry pathogenic hepadnaviruses antigenically related to hepatitis B virus and capable of infecting human hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110:16151–16156.
8. **He, B., Fan, Q., Yang, F., Hu, T., Qiu, W., Feng, Y., Li, Z., Li, Y., et al.**, 2013. Hepatitis Virus in Long-Fingered Bats, Myanmar. *Emerging Infectious Diseases*. 19:638–640.
9. **Guo, H., Mason, W.S., Aldrich, C.E., Saputelli, J.R., Miller, D.S., Jilbert, A.R., Newbold, J.E.**, 2005. Identification and characterization of avihepadnaviruses isolated from exotic anseriformes maintained in captivity. *Journal of virology*. 79:2729–2742.
10. **Jilg, W., Gerlich, W.H.**, 2014. *Klinischer Leitfaden Virushepatitis*. Wissenschaftliche Verlagsabteilung Abbott GmbH.
11. **Kramvis, A., Kew, M., François, G.**, 2005. Hepatitis B virus genotypes. *Vaccine*. 23:2409–2423.
12. **Tran, T.T.H., Trinh, T.N., Abe, K.**, 2008. New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam. *Journal of virology*. 82:5657–5663.
13. **Tatematsu, K., Tanaka, Y., Kurbanov, F., Sugauchi, F., Mano, S., Maeshiro, T., Nakayoshi, T., Wakuta, M., Miyakawa, Y., Mizokami, M.**, 2009. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. *Journal of virology*. 83:10538–10547.
14. **Sunbul, M.**, 2014. Hepatitis B virus genotypes: Global distribution and clinical importance. *World Journal of Gastroenterology : WJG*. 20:5427–5434.

15. **Lok, A.S.-F.**, 2016. Hepatitis B: 50 years after the discovery of Australia antigen. *Journal of viral hepatitis*. 23:5–14.
16. **Pujol, F.H., Navas, M.-C., Hainaut, P., Chemin, I.**, 2009. Worldwide genetic diversity of HBV genotypes and risk of hepatocellular carcinoma. *Cancer letters*. 286:80–88.
17. **Velkov, S., Ott, J.J., Protzer, U., Michler, T.**, 2018. The Global Hepatitis B Virus Genotype Distribution Approximated from Available Genotyping Data. *Genes*. 9.
18. **Cheng, J., Han, Y., Jiang, J.-D.**, 2014. Establishment of drug-resistant HBV small-animal models by hydrodynamic injection. *Acta pharmaceutica Sinica. B*. 4:270–276.
19. **Schädler, S., Hildt, E.**, 2009. HBV Life Cycle: Entry and Morphogenesis. *Viruses*. 1:185–209.
20. **Nassal, M., Schaller, H.**, 1993. Hepatitis B virus replication. *Trends in Microbiology*. 1:221–228.
21. **Seitz, S., Urban, S., Antoni, C., Böttcher, B.**, 2007. Cryo-electron microscopy of hepatitis B virions reveals variability in envelope capsid interactions. *The EMBO Journal*. 26:4160–4167.
22. **Siegler, V.D., Bruss, V.**, 2013. Role of Transmembrane Domains of Hepatitis B Virus Small Surface Proteins in Subviral-Particle Biogenesis. *Journal of virology*. 87:1491–1496.
23. **Mauss, S., Berg, T., Rockstroh, J., Sarrazin, C., Wedemeyer, H.**, 2015. *Hepatology 2015 - A Clinical Textbook*. 6th Edition. Flying Publisher.
24. **Bruns, M., Miska, S., Chassot, S., Will, H.**, 1998. Enhancement of Hepatitis B Virus Infection by Noninfectious Subviral Particles. *Journal of virology*. 72:1462–1468.
25. **Ganem, D.**, 1991. Assembly of hepadnaviral virions and subviral particles. *Current topics in microbiology and immunology*. 168:61–83.
26. **Gerlich, W.H., Kann, M.**, 2005. Hepatitis B. 1226-1268. In B. W. J. Mahy and V. ter Meulen (ed.), *Topley and Wilson's microbiology and microbial infections*, vol. 2. ASM Press, Washington, DC.
27. **Gerlich, W.H., Bremer, C., Saniewski, M., Schüttler, C.G., Wend, U.C., Willems, W.R., Glebe, D.**, 2010. Occult hepatitis B virus infection: detection and significance. *Digestive diseases (Basel, Switzerland)*. 28:116–125.
28. **Locarnini, S.**, 2004. Molecular virology of hepatitis B virus. *Seminars in liver disease*. 24 Suppl 1:3–10.
29. **Lu, X., Mehta, A., Dwek, R., Butters, T., Block, T.**, 1995. Evidence that N-linked glycosylation is necessary for hepatitis B virus secretion. *Virology*. 213:660–665.
30. **Schmitt, S., Glebe, D., Tolle, T.K., Lochnit, G., Linder, D., Geyer, R., Gerlich, W.H.**, 2004. Structure of pre-S2 N- and O-linked glycans in surface proteins from different genotypes of hepatitis B virus. *The Journal of general virology*. 85:2045–2053.

31. **Eble, B.E., MacRae, D.R., Lingappa, V.R., Ganem, D.**, 1987. Multiple topogenic sequences determine the transmembrane orientation of the hepatitis B surface antigen. *Molecular and cellular biology*. 7:3591–3601.
32. **Short, J.M., Chen, S., Roseman, A.M., Butler, P.J.G., Crowther, R.A.**, 2009. Structure of hepatitis B surface antigen from subviral tubes determined by electron cryomicroscopy. *Journal of molecular biology*. 390:135–141.
33. **Bruss, V., Ganem, D.**, 1991. The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88:1059–1063.
34. **Dryden, K.A., Wieland, S.F., Whitten-Bauer, C., Gerin, J.L., Chisari, F.V., Yeager, M.**, 2006. Native hepatitis B virions and capsids visualized by electron cryomicroscopy. *Molecular cell*. 22:843–850.
35. **Ruiz-Tachiquín, M.-E., Valdez-Salazar, H.-A., Juárez-Barreto, V., Dehesa-Violante, M., Torres, J., Muñoz-Hernández, O., Alvarez-Muñoz, M.-T.**, 2007. Molecular analysis of hepatitis B virus "a" determinant in asymptomatic and symptomatic Mexican carriers. *Virology journal*. 4:6.
36. **Bruss, V., Hagelstein, J., Gerhardt, E., Galle, P.R.**, 1996. Myristylation of the large surface protein is required for hepatitis B virus in vitro infectivity. *Virology*. 218:396–399.
37. **Gripon, P., Le Seyec, J., Rumin, S., Guguen-Guillouzo, C.**, 1995. Myristylation of the hepatitis B virus large surface protein is essential for viral infectivity. *Virology*. 213:292–299.
38. **Awe, K., Lambert, C., Prange, R.**, 2008. Mammalian BiP controls posttranslational ER translocation of the hepatitis B virus large envelope protein. *FEBS letters*. 582:3179–3184.
39. **Rapoport, T.A., Matlack, K.E., Plath, K., Misselwitz, B., Staack, O.**, 1999. Posttranslational protein translocation across the membrane of the endoplasmic reticulum. *Biological chemistry*. 380:1143–1150.
40. **Bruss, V., Lu, X., Thomssen, R., Gerlich, W.H.**, 1994. Post-translational alterations in transmembrane topology of the hepatitis B virus large envelope protein. *The EMBO Journal*. 13:2273–2279.
41. **Ostapchuk, P., Hearing, P., Ganem, D.**, 1994. A dramatic shift in the transmembrane topology of a viral envelope glycoprotein accompanies hepatitis B viral morphogenesis. *The EMBO Journal*. 13:1048–1057.
42. **Prange, R., Streeck, R.E.**, 1995. Novel transmembrane topology of the hepatitis B virus envelope proteins. *The EMBO Journal*. 14:247–256.
43. **Hildt, E., Munz, B., Saher, G., Reifenberg, K., Hofschneider, P.H.**, 2002. The PreS2 activator MHBs(t) of hepatitis B virus activates c-raf-1/Erk2 signaling in transgenic mice. *The EMBO Journal*. 21:525–535.

44. **Le Seyec, J., Chouteau, P., Cannie, I., Guguen-Guillouzo, C., Gripon, P.,** 1999. Infection Process of the Hepatitis B Virus Depends on the Presence of a Defined Sequence in the Pre-S1 Domain. *Journal of virology*. 73:2052–2057.
45. **Yan, H., Zhong, G., Xu, G., He, W., Jing, Z., Gao, Z., Huang, Y., Qi, Y., et al.,** 2012. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife*. 1:e00049.
46. **Glebe, D., Urban, S., Knoop, E.V., Cag, N., Krass, P., Grün, S., Bulavaite, A., Sasnauskas, K., Gerlich, W.H.,** 2005. Mapping of the hepatitis B virus attachment site by use of infection-inhibiting preS1 lipopeptides and tupaia hepatocytes. *Gastroenterology*. 129:234–245.
47. **Urban, S.,** 2008. New insights into hepatitis B and hepatitis delta virus entry. *Future Virology*. 3:253–264.
48. **Oess, S., Hildt, E.,** 2000. Novel cell permeable motif derived from the PreS2-domain of hepatitis-B virus surface antigens. *Gene therapy*. 7:750–758.
49. **Stoeckl, L., Funk, A., Kopitzki, A., Brandenburg, B., Oess, S., Will, H., Sirma, H., Hildt, E.,** 2006. Identification of a structural motif crucial for infectivity of hepatitis B viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103:6730–6734.
50. **Bruss, V.,** 2007. Hepatitis B virus morphogenesis. *World Journal of Gastroenterology : WJG*. 13:65–73.
51. **Salfeld, J., Pfaff, E., Noah, M., Schaller, H.,** 1989. Antigenic determinants and functional domains in core antigen and e antigen from hepatitis B virus. *Journal of virology*. 63:798–808.
52. **Sällberg, M., Rudén, U., Magnusius, L.O., Harthus, H.P., Noah, M., Wahren, B.,** 1991. Characterisation of a linear binding site for a monoclonal antibody to hepatitis B core antigen. *Journal of medical virology*. 33:248–252.
53. **Wynne, S.A., Crowther, R.A., Leslie, A.G.,** 1999. The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid. *Molecular cell*. 3:771–780.
54. **Nassal, M., Rieger, A., Steinau, O.,** 1992. Topological analysis of the hepatitis B virus core particle by cysteine-cysteine cross-linking. *Journal of molecular biology*. 225:1013–1025.
55. **Zhou, S., Standring, D.N.,** 1992. Hepatitis B virus capsid particles are assembled from core-protein dimer precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89:10046–10050.
56. **Lingappa, J.R., Martin, R.L., Wong, M.L., Ganem, D., Welch, W.J., Lingappa, V.R.,** 1994. A eukaryotic cytosolic chaperonin is associated with a high molecular weight intermediate in the assembly of hepatitis B virus capsid, a multimeric particle. *The Journal of Cell Biology*. 125:99–111.

57. **Katen, S., Zlotnick, A.**, 2009-<2011>. Chapter 14 The Thermodynamics of Virus Capsid Assembly. p. 395–417. In M.L. Johnson, J.M. Holt, G.K. Ackers (Eds.). *Biothermodynamics*. Elsevier/Academic Press. Amsterdam, Boston.
58. **Crowther, R.**, 1994. Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell*. 77:943–950.
59. **Stannard, L.M., Hodgkiss, M.**, 1979. Morphological irregularities in Dane particle cores. *The Journal of general virology*. 45:509–514.
60. **Stray, S.J., Ceres, P., Zlotnick, A.**, 2004. Zinc ions trigger conformational change and oligomerization of hepatitis B virus capsid protein. *Biochemistry*. 43:9989–9998.
61. **Akhras, S., Toda, M., Boller, K., Himmelsbach, K., Elgner, F., Biehl, M., Scheurer, S., Gratz, M., Vieths, S., Hildt, E.**, 2017. Cell-permeable capsids as universal antigen carrier for the induction of an antigen-specific CD8+ T-cell response. *Scientific reports*. 7:9630.
62. **Harms, Z.D., Haywood, D.G., Kneller, A.R., Selzer, L., Zlotnick, A., Jacobson, S.C.**, 2015. Single-particle electrophoresis in nanochannels. *Analytical chemistry*. 87:699–705.
63. **Zlotnick, A., Cheng, N., Conway, J.F., Booy, F.P., Steven, A.C., Stahl, S.J., Wingfield, P.T.**, 1996. Dimorphism of hepatitis B virus capsids is strongly influenced by the C-terminus of the capsid protein. *Biochemistry*. 35:7412–7421.
64. **Zlotnick, A., Cheng, N., Stahl, S.J., Conway, J.F., Steven, A.C., Wingfield, P.T.**, 1997. Localization of the C terminus of the assembly domain of hepatitis B virus capsid protein: implications for morphogenesis and organization of encapsidated RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94:9556–9561.
65. **Conway, J.F., Watts, N.R., Belnap, D.M., Cheng, N., Stahl, S.J., Wingfield, P.T., Steven, A.C.**, 2003. Characterization of a Conformational Epitope on Hepatitis B Virus Core Antigen and Quasiequivalent Variations in Antibody Binding. *Journal of virology*. 77:6466–6473.
66. **Nassal, M.**, 2008. Hepatitis B viruses: reverse transcription a different way. *Virus research*. 134:235–249.
67. **Lutwick, L.I., Robinson, W.S.**, 1977. DNA synthesized in the hepatitis B Dane particle DNA polymerase reaction. *Journal of virology*. 21:96–104.
68. **Summers, J.**, 1988. The replication cycle of hepatitis B viruses. *Cancer*. 61:1957–1962.
69. **Bartenschlager, R., Schaller, H.**, 1988. The amino-terminal domain of the hepadnaviral P-gene encodes the terminal protein (genome-linked protein) believed to prime reverse transcription. *The EMBO Journal*. 7:4185–4192.
70. **Beck, J., Nassal, M.**, 2007. Hepatitis B virus replication. *World Journal of Gastroenterology : WJG*. 13:48–64.
71. **Saeed, U., Waheed, Y., Ashraf, M., Ciotti, M.**, 2014. Hepatitis B and hepatitis C viruses: a review of viral genomes, viral induced host immune responses, genotypic distributions and worldwide epidemiology. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 4:88–96.

72. **Tong, S., Revill, P.**, 2016. Overview of hepatitis B viral replication and genetic variability. *Journal of hepatology*. 64:S4-S16.
73. **Nagaya, T., Nakamura, T., Tokino, T., Tsurimoto, T., Imai, M., Mayumi, T., Kamino, K., Yamamura, K., Matsubara, K.**, 1987. The mode of hepatitis B virus DNA integration in chromosomes of human hepatocellular carcinoma. *Genes & development*. 1:773–782.
74. **Guo, H., Xu, C., Zhou, T., Block, T.M., Guo, J.-T.**, 2012. Characterization of the host factors required for hepadnavirus covalently closed circular (ccc) DNA formation. *PloS one*. 7:e43270.
75. **Schreiner, S., Nassal, M.**, 2017. A Role for the Host DNA Damage Response in Hepatitis B Virus cccDNA Formation-and Beyond? *Viruses*. 9.
76. **Seeger, C., Mason, W.S.**, 2000. Hepatitis B virus biology. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 64:51–68.
77. **Jones, S.A., Hu, J.**, 2013. Hepatitis B virus reverse transcriptase: diverse functions as classical and emerging targets for antiviral intervention. *Emerging Microbes & Infections*. 2:e56-.
78. **Walter, E., Keist, R., Niederöst, B., Pult, I., Blum, H.E.**, 1996. Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes in vitro and in vivo. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 24:1–5.
79. **Köck, J., Nassal, M., MacNelly, S., Baumert, T.F., Blum, H.E., Weizsäcker, F. von**, 2001. Efficient infection of primary tupaia hepatocytes with purified human and woolly monkey hepatitis B virus. *Journal of virology*. 75:5084–5089.
80. **Guidotti, L.G., Chisari, F.V.**, 2006. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annual review of pathology*. 1:23–61.
81. **Schulze, A., Gripon, P., Urban, S.**, 2007. Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 46:1759–1768.
82. **Leistner, C.M., Gruen-Bernhard, S., Glebe, D.**, 2008. Role of glycosaminoglycans for binding and infection of hepatitis B virus. *Cellular microbiology*. 10:122–133.
83. **Offensperger, W.-B., Offensperger, S., Walter, E., Blum, H.E., Gerok, W.**, 1991. Inhibition of duck hepatitis B virus infection by lysosomotropic agents. *Virology*. 183:415–418.
84. **Hafner, A., Brandenburg, B., Hildt, E.**, 2003. Reconstitution of gene expression from a regulatory-protein-deficient hepatitis B virus genome by cell-permeable HBx protein. *EMBO reports*. 4:767–773.
85. **Bleifuss, E., Kammertoens, T., Hutloff, A., Quarcoo, D., Dorner, M., Straub, P., Uckert, W., Hildt, E.**, 2006. The translocation motif of hepatitis B virus improves protein vaccination. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 63:627–635.
86. **Brandenburg, B., Stockl, L., Gutzeit, C., Roos, M., Lupberger, J., Schwartlander, R., Gelderblom, H., Sauer, I.M., Hofschneider, P.H., Hildt, E.**, 2005. A novel system for

- efficient gene transfer into primary human hepatocytes via cell-permeable hepatitis B virus-like particle. *Hepatology* (Baltimore, Md.). *42*:1300–1309.
87. **Lepère, C., Régeard, M., Le Seyec, J., Gripon, P.**, 2007. The translocation motif of hepatitis B virus envelope proteins is dispensable for infectivity. *Journal of virology*. *81*:7816–7818.
 88. **Döhner, K., Sodeik, B.**, 2005. The role of the cytoskeleton during viral infection. *Current topics in microbiology and immunology*. *285*:67–108.
 89. **Rabe, B., Glebe, D., Kann, M.**, 2006. Lipid-Mediated Introduction of Hepatitis B Virus Capsids into Nonsusceptible Cells Allows Highly Efficient Replication and Facilitates the Study of Early Infection Events. *Journal of virology*. *80*:5465–5473.
 90. **Kann, M., Sodeik, B., Vlachou, A., Gerlich, W.H., Helenius, A.**, 1999. Phosphorylation-dependent Binding of Hepatitis B Virus Core Particles to the Nuclear Pore Complex. *The Journal of Cell Biology*. *145*:45–55.
 91. **Eckhardt, S.G., Milich, D.R., McLachlan, A.**, 1991. Hepatitis B virus core antigen has two nuclear localization sequences in the arginine-rich carboxyl terminus. *Journal of virology*. *65*:575–582.
 92. **Schmitz, A., Schwarz, A., Foss, M., Zhou, L., Rabe, B., Hoellenriegel, J., Stoeber, M., Panté, N., Kann, M.**, 2010. Nucleoporin 153 Arrests the Nuclear Import of Hepatitis B Virus Capsids in the Nuclear Basket. *PLoS Pathogens*. *6*.
 93. **Newbold, J.E., Xin, H., Tencza, M., Sherman, G., Dean, J., Bowden, S., Locarnini, S.**, 1995. The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists in situ as a heterogeneous population of viral minichromosomes. *Journal of virology*. *69*:3350–3357.
 94. **Tuttleman, J.S., Pourcel, C., Summers, J.**, 1986. Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell*. *47*:451–460.
 95. **Bock, C.T., Schranz, P., Schröder, C.H., Zentgraf, H.**, 1994. Hepatitis B virus genome is organized into nucleosomes in the nucleus of the infected cell. *Virus genes*. *8*:215–229.
 96. **Bock, C.T., Schwinn, S., Locarnini, S., Fyfe, J., Manns, M.P., Trautwein, C., Zentgraf, H.**, 2001. Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome. *Journal of molecular biology*. *307*:183–196.
 97. **Raney, A.K., Le, H.B., McLachlan, A.**, 1992. Regulation of transcription from the hepatitis B virus major surface antigen promoter by the Sp1 transcription factor. *Journal of virology*. *66*:6912–6921.
 98. **Wei, X., Peterson, D.L.**, 1996. Expression, purification, and characterization of an active RNase H domain of the hepatitis B viral polymerase. *The Journal of biological chemistry*. *271*:32617–32622.
 99. **Katzmann, D.J., Odorizzi, G., Emr, S.D.**, 2002. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nature reviews. Molecular cell biology*. *3*:893–905.

100. **Hanson, P.I., Cashikar, A.**, 2012. Multivesicular body morphogenesis. Annual review of cell and developmental biology. 28:337–362.
101. **Pastor, F., Herrscher, C., Patient, R., Eymieux, S., Moreau, A., Burlaud-Gaillard, J., Seigneuret, F., Rocquigny, H. de, Roingeard, P., Hourieux, C.**, 2019. Direct interaction between the hepatitis B virus core and envelope proteins analyzed in a cellular context. Scientific reports. 9:16178.
102. **Thangadurai, D., Sangeetha, J. (Eds.)**, 2014. Biotechnology and bioinformatics. Advances and applications for bioenergy, bioremediation, and biopharmaceutical research. Apple Academic Press. Toronto.
103. **Jiang, B., Himmelsbach, K., Ren, H., Boller, K., Hildt, E.**, 2015. Subviral Hepatitis B Virus Filaments, like Infectious Viral Particles, Are Released via Multivesicular Bodies. Journal of virology. 90:3330–3341.
104. **WHO**, 2019. Hepatitis B. Available at <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>. Accessed December 02, 2019.
105. **Nelson, N.P., Easterbrook, P.J., McMahon, B.J.**, 2016. Epidemiology of Hepatitis B Virus Infection and Impact of Vaccination on Disease. Clinics in liver disease. 20:607–628.
106. **Schweitzer, A., Horn, J., Mikolajczyk, R.T., Krause, G., Ott, J.J.**, 2015. Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013. The Lancet. 386:1546–1555.
107. **Jefferies, M., Rauff, B., Rashid, H., Lam, T., Rafiq, S.**, 2018. Update on global epidemiology of viral hepatitis and preventive strategies. World journal of clinical cases. 6:589–599.
108. **Hepatitis B Foundation**, 2019. Hepatitis B Foundation: Hep B Symptoms, Common and Serious Symptoms. Available at <https://www.hepb.org/what-is-hepatitis-b/what-is-hepb/symptoms/>. Accessed December 03, 2019.
109. **Hyams, K.C.**, 1995. Risks of chronicity following acute hepatitis B virus infection: a review. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 20:992–1000.
110. **Krugman, S., Overby, L.R., Mushahwar, I.K., Ling, C.M., Frösner, G.G., Deinhardt, F.**, 1979. Viral hepatitis, type B. Studies on natural history and prevention re-examined. The New England journal of medicine. 300:101–106.
111. **Liang, T.J., Ghany, M.**, 2002. Hepatitis B e Antigen--the dangerous endgame of hepatitis B. The New England journal of medicine. 347:208–210.
112. **Webster, G.J., Reignat, S., Maini, M.K., Whalley, S.A., Ogg, G.S., King, A., Brown, D., Amlot, P.L., et al.**, 2000. Incubation phase of acute hepatitis B in man: dynamic of cellular immune mechanisms. Hepatology (Baltimore, Md.). 32:1117–1124.

113. **Thimme, R., Wieland, S., Steiger, C., Ghrayeb, J., Reimann, K.A., Purcell, R.H., Chisari, F.V.**, 2003. CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *Journal of virology*. 77:68–76.
114. **Tabor, E., Hoofnagle, J.H., Barker, L.F., Pineda-Tamondong, G., Nath, N., Smallwood, L.A., Gerety, R.J.**, 1981. Antibody to hepatitis B core antigen in blood donors with a history of hepatitis. *Transfusion*. 21:366–371.
115. **Chisari, F.V., Isogawa, M., Wieland, S.F.**, 2010. Pathogenesis of Hepatitis B Virus Infection. *Pathologie-biologie*. 58:258–266.
116. **Rehermann, B., Nascimbeni, M.**, 2005. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nature reviews. Immunology*. 5:215–229.
117. **Wieland, S., Thimme, R., Purcell, R.H., Chisari, F.V.**, 2004. Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101:6669–6674.
118. **Wieland, S.F., Chisari, F.V.**, 2005. Stealth and cunning: hepatitis B and hepatitis C viruses. *Journal of virology*. 79:9369–9380.
119. **Oh, I.S., Park, S.-H.**, 2015. Immune-mediated Liver Injury in Hepatitis B Virus Infection. *Immune network*. 15:191–198.
120. **Chang, J.J., Lewin, S.R.**, 2007. Immunopathogenesis of hepatitis B virus infection. *Immunology and cell biology*. 85:16–23.
121. **Liang, T.J.**, 2009. Hepatitis B: the virus and disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 49:S13-21.
122. WHO, 2017. Global Hepatitis Report, 2017.
123. **Lee, W.M.**, 1997. Hepatitis B virus infection. *The New England journal of medicine*. 337:1733–1745.
124. **Boonstra, A., Woltman, A.M., Janssen, H.L.A.**, 2008. Immunology of hepatitis B and hepatitis C virus infections. *Best practice & research. Clinical gastroenterology*. 22:1049–1061.
125. **Dunn, C., Peppas, D., Khanna, P., Nebbia, G., Jones, M., Brendish, N., Lascar, R.M., Brown, D., et al.**, 2009. Temporal analysis of early immune responses in patients with acute hepatitis B virus infection. *Gastroenterology*. 137:1289–1300.
126. **Sato, S., Li, K., Kameyama, T., Hayashi, T., Ishida, Y., Murakami, S., Watanabe, T., Iijima, S., et al.**, 2015. The RNA sensor RIG-I dually functions as an innate sensor and direct antiviral factor for hepatitis B virus. *Immunity*. 42:123–132.
127. **Wang, H., Ryu, W.-S.**, 2010. Hepatitis B virus polymerase blocks pattern recognition receptor signaling via interaction with DDX3: implications for immune evasion. *PLoS Pathogens*. 6:e1000986.

128. **Yu, S., Chen, J., Wu, M., Chen, H., Kato, N., Yuan, Z.,** 2010. Hepatitis B virus polymerase inhibits RIG-I- and Toll-like receptor 3-mediated beta interferon induction in human hepatocytes through interference with interferon regulatory factor 3 activation and dampening of the interaction between TBK1/IKKepsilon and DDX3. *The Journal of general virology*. 91:2080–2090.
129. **Kumar, M., Jung, S.Y., Hodgson, A.J., Madden, C.R., Qin, J., Slagle, B.L.,** 2011. Hepatitis B virus regulatory HBx protein binds to adaptor protein IPS-1 and inhibits the activation of beta interferon. *Journal of virology*. 85:987–995.
130. **Wang, X., Li, Y., Mao, A., Li, C., Li, Y., Tien, P.,** 2010. Hepatitis B virus X protein suppresses virus-triggered IRF3 activation and IFN-beta induction by disrupting the VISA-associated complex. *Cellular & molecular immunology*. 7:341–348.
131. **Isogawa, M., Robek, M.D., Furuichi, Y., Chisari, F.V.,** 2005. Toll-Like Receptor Signaling Inhibits Hepatitis B Virus Replication In Vivo†. *Journal of virology*. 79:7269–7272.
132. **Li, M., Sun, R., Xu, L., Yin, W., Chen, Y., Zheng, X., Lian, Z., Wei, H., Tian, Z.,** 2015. Kupffer Cells Support Hepatitis B Virus-Mediated CD8+ T Cell Exhaustion via Hepatitis B Core Antigen-TLR2 Interactions in Mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 195:3100–3109.
133. **Lang, T., Lo, C., Skinner, N., Locarnini, S., Visvanathan, K., Mansell, A.,** 2011. The hepatitis B e antigen (HBeAg) targets and suppresses activation of the toll-like receptor signaling pathway. *Journal of hepatology*. 55:762–769.
134. **Tsai, K.-N., Kuo, C.-F., Ou, J.-H.J.,** 2018. Mechanisms of Hepatitis B Virus Persistence. *Trends in Microbiology*. 26:33–42.
135. **Kondo, Y., Ninomiya, M., Kakazu, E., Kimura, O., Shimosegawa, T.,** 2013. Hepatitis B Surface Antigen Could Contribute to the Immunopathogenesis of Hepatitis B Virus Infection. *ISRN Gastroenterology*. 2013.
136. **van der Molen, R.G., Sprengers, D., Binda, R.S., Jong, E.C. de, Niesters, H.G.M., Kusters, J.G., Kwekkeboom, J., Janssen, H.L.A.,** 2004. Functional impairment of myeloid and plasmacytoid dendritic cells of patients with chronic hepatitis B. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 40:738–746.
137. **Zheng, B.J., Zhou, J., Qu, D., Siu, K.L., Lam, T.W., Lo, H.Y., Lee, S.S., Wen, Y.M.,** 2004. Selective functional deficit in dendritic cell--T cell interaction is a crucial mechanism in chronic hepatitis B virus infection. *Journal of viral hepatitis*. 11:217–224.
138. **Xu, Y., Hu, Y., Shi, B., Zhang, X., Wang, J., Zhang, Z., Shen, F., Zhang, Q., Sun, S., Yuan, Z.,** 2009. HBsAg inhibits TLR9-mediated activation and IFN-alpha production in plasmacytoid dendritic cells. *Molecular immunology*. 46:2640–2646.
139. **Beckebaum, S., Cicinnati, V.R., Zhang, X., Ferencik, S., Frilling, A., Grosse-Wilde, H., Broelsch, C.E., Gerken, G.,** 2003. Hepatitis B virus-induced defect of monocyte-derived dendritic cells leads to impaired T helper type 1 response in vitro: mechanisms for viral immune escape. *Immunology*. 109:487–495.

140. **Op den Brouw, M.L., Binda, R.S., van Roosmalen, M.H., Protzer, U., Janssen, H.L.A., van der Molen, R.G., Woltman, A.M.,** 2009. Hepatitis B virus surface antigen impairs myeloid dendritic cell function: a possible immune escape mechanism of hepatitis B virus. *Immunology*. 126:280–289.
141. **Wang, S., Chen, Z., Hu, C., Qian, F., Cheng, Y., Wu, M., Shi, B., Chen, J., Hu, Y., Yuan, Z.,** 2013. Hepatitis B virus surface antigen selectively inhibits TLR2 ligand-induced IL-12 production in monocytes/macrophages by interfering with JNK activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 190:5142–5151.
142. **Cheng, J., Imanishi, H., Morisaki, H., Liu, W., Nakamura, H., Morisaki, T., Hada, T.,** 2005. Recombinant HBsAg inhibits LPS-induced COX-2 expression and IL-18 production by interfering with the NFkappaB pathway in a human monocytic cell line, THP-1. *Journal of hepatology*. 43:465–471.
143. **Zhang, X., Lu, W., Zheng, Y., Wang, W., Bai, L., Chen, L., Feng, Y., Zhang, Z., Yuan, Z.,** 2016. In situ analysis of intrahepatic virological events in chronic hepatitis B virus infection. *The Journal of clinical investigation*. 126:1079–1092.
144. **Bertoletti, A., Ferrari, C.,** 2016. Adaptive immunity in HBV infection. *Journal of hepatology*. 64:S71-S83.
145. **Boni, C., Fisicaro, P., Valdatta, C., Amadei, B., Di Vincenzo, P., Giuberti, T., Laccabue, D., Zerbini, A., et al.,** 2007. Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection. *Journal of virology*. 81:4215–4225.
146. **Lumley, S.F., McNaughton, A.L., Klenerman, P., Lythgoe, K.A., Matthews, P.C.,** 2018. Hepatitis B Virus Adaptation to the CD8+ T Cell Response: Consequences for Host and Pathogen. *Frontiers in immunology*. 9:1561.
147. **Wenjin, Z., Chuanhui, P., Yunle, W., Lateef, S.A., Shusen, Z.,** 2012. Longitudinal fluctuations in PD1 and PD-L1 expression in association with changes in anti-viral immune response in chronic hepatitis B. *BMC Gastroenterology*. 12:109.
148. **Bengsch, B., Martin, B., Thimme, R.,** 2014. Restoration of HBV-specific CD8+ T cell function by PD-1 blockade in inactive carrier patients is linked to T cell differentiation. *Journal of hepatology*. 61:1212–1219.
149. **Nebbia, G., Peppia, D., Schurich, A., Khanna, P., Singh, H.D., Cheng, Y., Rosenberg, W., Dusheiko, G., et al.,** 2012. Upregulation of the Tim-3/galectin-9 pathway of T cell exhaustion in chronic hepatitis B virus infection. *PloS one*. 7:e47648.
150. **Schurich, A., Khanna, P., Lopes, A.R., Han, K.J., Peppia, D., Micco, L., Nebbia, G., Kennedy, P.T.F., et al.,** 2011. Role of the coinhibitory receptor cytotoxic T lymphocyte antigen-4 on apoptosis-Prone CD8 T cells in persistent hepatitis B virus infection. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 53:1494–1503.
151. **Rehermann, B.,** 2013. Pathogenesis of Chronic Viral Hepatitis: Differential Roles of T cells and NK cells. *Nature medicine*. 19:859–868.

152. **Pellicoro, A., Ramachandran, P., Iredale, J.P., Fallowfield, J.A.**, 2014. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nature reviews. Immunology*. 14:181–194.
153. **Ramadori, G., Saile, B.**, 2004. Inflammation, damage repair, immune cells, and liver fibrosis: specific or nonspecific, this is the question. *Gastroenterology*. 127:997–1000.
154. **Arriazu, E., Ruiz de Galarreta, M., Cubero, F.J., Varela-Rey, M., Pérez de Obanos, M.P., Leung, T.M., Lopategi, A., Benedicto, A., Abraham-Enachescu, I., Nieto, N.**, 2014. Extracellular matrix and liver disease. *Antioxidants & redox signaling*. 21:1078–1097.
155. **Tseng, T.-C., Kao, J.-H.**, 2012. Clinical utility of quantitative HBsAg in natural history and nucleos(t)ide analogue treatment of chronic hepatitis B: new trick of old dog. *Journal of gastroenterology*. 48:13–21.
156. **Liaw, Y.-F., Chu, C.-M.**, 2009. Hepatitis B virus infection. *The Lancet*. 373:582–592.
157. **Chan, H.L., Hussain, M., Lok, A.S.**, 1999. Different hepatitis B virus genotypes are associated with different mutations in the core promoter and precore regions during hepatitis B e antigen seroconversion. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 29:976–984.
158. **Chen, C.-H., Lee, C.-M., Lu, S.-N., Changchien, C.-S., Eng, H.-L., Huang, C.-M., Wang, J.-H., Hung, C.-H., Hu, T.-H.**, 2005. Clinical Significance of Hepatitis B Virus (HBV) Genotypes and Precore and Core Promoter Mutations Affecting HBV e Antigen Expression in Taiwan. *Journal of Clinical Microbiology*. 43:6000–6006.
159. **Lok, A.S., Zoulim, F., Dusheiko, G., Ghany, M.G.**, 2017. Hepatitis B cure: From discovery to regulatory approval. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 66:1296–1313.
160. **Blumberg, B.S., Millman, I., Grove, W.**, 1969. Vaccine against viral hepatitis and process.
161. **Beasley, R.P., Hwang, L.-Y.**, 1984. Immunogenicity of Hepatitis B Virus Vaccine (Heptavax-B)—Response of Healthy Adults. *Western Journal of Medicine*. 140:731–734.
162. **Assad, S., Francis, A.**, 1999. Over a decade of experience with a yeast recombinant hepatitis B vaccine. *Vaccine*. 18:57–67.
163. **Keating, G.M., Noble, S.**, 2003. Recombinant hepatitis B vaccine (Engerix-B): a review of its immunogenicity and protective efficacy against hepatitis B. *Drugs*. 63:1021–1051.
164. **Krawczyk, A., Ludwig, C., Jochum, C., Fiedler, M., Heinemann, F.M., Shouval, D., Roggendorf, M., Roggendorf, H., Lindemann, M.**, 2014. Induction of a robust T- and B-cell immune response in non- and low-responders to conventional vaccination against hepatitis B by using a third generation PreS/S vaccine. *Vaccine*. 32:5077–5082.
165. **FDA**, 2019. HEPLISAV-B Lead Page. Available at <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/vaccines/heplisav-b>. Accessed December 10, 2019.

166. **Dynavax Technologies Corporation**, 2017. HEPLISAV-B [Hepatitis B Vaccine (Recombinant) Adjuvanted Package Insert. Available at <https://www.fda.gov/media/108745/download>. Accessed December 10, 2019.
167. **Mohsen, M.O., Zha, L., Cabral-Miranda, G., Bachmann, M.F.**, 2017. Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines. *Seminars in immunology*. 34:123–132.
168. **Pol, S., Driss, F., Michel, M.L., Nalpas, B., Berthelot, P., Brechot, C.**, 1994. Specific vaccine therapy in chronic hepatitis B infection. *Lancet (London, England)*. 344:342.
169. **Goncalves, L., Albarran, B., Salmen, S., Borges, L., Fields, H., Montes, H., Soyano, A., Diaz, Y., Berrueta, L.**, 2004. The nonresponse to hepatitis B vaccination is associated with impaired lymphocyte activation. *Virology*. 326:20–28.
170. **Rehermann, B., Ferrari, C., Pasquinelli, C., Chisari, F.V.**, 1996. The hepatitis B virus persists for decades after patients' recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T-lymphocyte response. *Nature medicine*. 2:1104–1108.
171. **Lin, S.-M., Yu, M.-L., Lee, C.-M., Chien, R.-N., Sheen, I.-S., Chu, C.-M., Liaw, Y.-F.**, 2007. Interferon therapy in HBeAg positive chronic hepatitis reduces progression to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology*. 46:45–52.
172. **Wong, D.K., Cheung, A.M., O'Rourke, K., Naylor, C.D., Detsky, A.S., Heathcote, J.**, 1993. Effect of alpha-interferon treatment in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. A meta-analysis. *Annals of internal medicine*. 119:312–323.
173. **Trépo, C., Chan, H.L.Y., Lok, A.**, 2014. Hepatitis B virus infection. *The Lancet*. 384:2053–2063.
174. **Menéndez-Arias, L., Álvarez, M., Pacheco, B.**, 2014. Nucleoside/nucleotide analog inhibitors of hepatitis B virus polymerase: mechanism of action and resistance. *Current opinion in virology*. 8:1–9.
175. **Koumbi, L.**, 2015. Current and future antiviral drug therapies of hepatitis B chronic infection. *World journal of hepatology*. 7:1030–1040.
176. **Lai, C.-L., Dienstag, J., Schiff, E., Leung, N.W.Y., Atkins, M., Hunt, C., Brown, N., Woessner, M., Boehme, R., Condreay, L.**, 2003. Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy for patients with chronic hepatitis B. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 36:687–696.
177. **Han, G.-R., Cao, M.-K., Zhao, W., Jiang, H.-X., Wang, C.-M., Bai, S.-F., Yue, X., Wang, G.-J., Tang, X., Fang, Z.-X.**, 2011. A prospective and open-label study for the efficacy and safety of telbivudine in pregnancy for the prevention of perinatal transmission of hepatitis B virus infection. *Journal of hepatology*. 55:1215–1221.
178. **Han, G.-R., Jiang, H.-X., Yue, X., Ding, Y., Wang, C.-M., Wang, G.-J., Yang, Y.-F.**, 2015. Efficacy and safety of telbivudine treatment: an open-label, prospective study in

- pregnant women for the prevention of perinatal transmission of hepatitis B virus infection. *Journal of viral hepatitis*. 22:754–762.
179. **Marcellin, P., Chang, T.-T., Lim, S.G.L., Sievert, W., Tong, M., Arterburn, S., Borroto-Esoda, K., Frederick, D., Rousseau, F.,** 2008. Long-term efficacy and safety of adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 48:750–758.
 180. **Seto, W.-K., Lai, C.-L., Fung, J., Wong, D.K.-H., Yuen, J.C.-H., Hung, I.F.-N., Yuen, M.-F.,** 2011. Significance of HBV DNA levels at 12 weeks of telbivudine treatment and the 3 years treatment outcome. *Journal of hepatology*. 55:522–528.
 181. **Protzer, U., Knolle, P.,** 2016. "To Be or Not to Be": Immune Tolerance in Chronic Hepatitis B. *Gastroenterology*. 151:805–806.
 182. **Rollier, C., Sunyach, C., Barraud, L., Madani, N., Jamard, C., Trepo, C., Cova, L.,** 1999. Protective and therapeutic effect of DNA-based immunization against hepatitis B large envelope protein. *Gastroenterology*. 116:658–665.
 183. **Vandepapelière, P., Lau, G.K.K., Leroux-Roels, G., Horsmans, Y., Gane, E., Tawandee, T., Merican, M.I.b., Win, K.M., et al.,** 2007. Therapeutic vaccination of chronic hepatitis B patients with virus suppression by antiviral therapy: a randomized, controlled study of co-administration of HBsAg/AS02 candidate vaccine and lamivudine. *Vaccine*. 25:8585–8597.
 184. **Pol, S., Nalpas, B., Driss, F., Michel, M.-L., Tiollais, P., Denis, J., Bréchet, C.,** 2001. Efficacy and limitations of a specific immunotherapy in chronic hepatitis B. *Journal of hepatology*. 34:917–921.
 185. **Depla, E., van der Aa, A., Livingston, B.D., Crimi, C., Allosery, K., Brabandere, V. de, Krakover, J., Murthy, S., et al.,** 2008. Rational design of a multiepitope vaccine encoding T-lymphocyte epitopes for treatment of chronic hepatitis B virus infections. *Journal of virology*. 82:435–450.
 186. **Kosinska, A.D., Bauer, T., Protzer, U.,** 2017. Therapeutic vaccination for chronic hepatitis B. *Current opinion in virology*. 23:75–81.
 187. **Xu, D.-Z., Wang, X.-Y., Shen, X.-L., Gong, G.-Z., Ren, H., Guo, L.-M., Sun, A.-M., Xu, M., et al.,** 2013. Results of a phase III clinical trial with an HBsAg-HBIG immunogenic complex therapeutic vaccine for chronic hepatitis B patients: experiences and findings. *Journal of hepatology*. 59:450–456.
 188. **Godon, O., Fontaine, H., Kahi, S., Meritet, J.F., Scott-Algara, D., Pol, S., Michel, M.L., Bourguine, M.,** 2014. Immunological and antiviral responses after therapeutic DNA immunization in chronic hepatitis B patients efficiently treated by analogues. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 22:675–684.
 189. **Fontaine, H., Kahi, S., Chazallon, C., Bourguine, M., Varaut, A., Buffet, C., Godon, O., Meritet, J.F., et al.,** 2015. Anti-HBV DNA vaccination does not prevent relapse after discontinuation of analogues in the treatment of chronic hepatitis B: a randomised trial--ANRS HB02 VAC-ADN. *Gut*. 64:139–147.

190. **Pancholi, P., Lee, D.H., Liu, Q., Tackney, C., Taylor, P., Perkus, M., Andrus, L., Brotman, B., Prince, A.M.**, 2001. DNA prime/canarypox boost-based immunotherapy of chronic hepatitis B virus infection in a chimpanzee. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 33:448–454.
191. **Cavanaugh, J.S., Awi, D., Mendy, M., Hill, A.V.S., Whittle, H., McConkey, S.J.**, 2011. Partially randomized, non-blinded trial of DNA and MVA therapeutic vaccines based on hepatitis B virus surface protein for chronic HBV infection. *PloS one*. 6:e14626.
192. **Cassaday, R.D., Sondel, P.M., King, D.M., Macklin, M.D., Gan, J., Warner, T.F., Zuleger, C.L., Bridges, A.J., et al.**, 2007. A phase I study of immunization using particle-mediated epidermal delivery of genes for gp100 and GM-CSF into uninvolved skin of melanoma patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 13:540–549.
193. **Fisicaro, P., Boni, C., Barili, V., Laccabue, D., Ferrari, C.**, 2018. Strategies to overcome HBV-specific T cell exhaustion: checkpoint inhibitors and metabolic re-programming. *Current opinion in virology*. 30:1–8.
194. **Fanning, G.C., Zoulim, F., Hou, J., Bertoletti, A.**, 2019. Therapeutic strategies for hepatitis B virus infection: towards a cure. *Nature reviews. Drug discovery*. 18:827–844.
195. **Pumpens, P., Grens, E.**, 2003. Artificial Genes for Chimeric Virus-Like Particles. In Y.E. Khudyakov, H.A. Fields (Eds.). *Artificial DNA. Methods and applications*. CRC Press. Boca Raton, Fla.
196. **Jennings, G.T., Bachmann, M.F.**, 2007. Designing recombinant vaccines with viral properties: a rational approach to more effective vaccines. *Current molecular medicine*. 7:143–155.
197. **Khudyakov, Y., Pumpens, P.**, 2015. *Viral Nanotechnology*. CRC Press.
198. **Hwang, D.J., Roberts, I.M., Wilson, T.M.**, 1994. Expression of tobacco mosaic virus coat protein and assembly of pseudovirus particles in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91:9067–9071.
199. **Brown, S.D., Fiedler, J.D., Finn, M.G.**, 2009. Assembly of hybrid bacteriophage Qbeta virus-like particles. *Biochemistry*. 48:11155–11157.
200. **Zeltins, A.**, 2013. Construction and characterization of virus-like particles: a review. *Molecular biotechnology*. 53:92–107.
201. **Tissot, A.C., Renhofa, R., Schmitz, N., Cielens, I., Meijerink, E., Ose, V., Jennings, G.T., Saudan, P., Pumpens, P., Bachmann, M.F.**, 2010. Versatile virus-like particle carrier for epitope based vaccines. *PloS one*. 5:e9809.
202. **Giovannelli, L., Campisi, G., Lama, A., Giambalvo, O., Osborn, J., Margiotta, V., Ammatuna, P.**, 2002. Human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions. *The Journal of infectious diseases*. 185:833–836.
203. **Siddiqui, M.A.A., Perry, C.M.**, 2006. Human papillomavirus quadrivalent (types 6, 11, 16, 18) recombinant vaccine (Gardasil). *Drugs*. 66:1263-71; discussion 1272-3.

204. **Szarewski, A.**, 2010. HPV vaccine: Cervarix. Expert opinion on biological therapy. *10*:477–487.
205. **Zhai, L., Tumban, E.**, 2016. Gardasil-9: A global survey of projected efficacy. *Antiviral research. 130*:101–109.
206. **Dale, C.J., Liu, X.S., Rose, R. de, Purcell, D.F.J., Anderson, J., Xu, Y., Leggatt, G.R., Frazer, I.H., Kent, S.J.**, 2002. Chimeric human papilloma virus-simian/human immunodeficiency virus virus-like-particle vaccines: immunogenicity and protective efficacy in macaques. *Virology. 301*:176–187.
207. **McLain, L., Durrani, Z., Wisniewski, L.A., Porta, C., Lomonossoff, G.P., Dimmock, N.J.**, 1996. Stimulation of neutralizing antibodies to human immunodeficiency virus type 1 in three strains of mice immunized with a 22 amino acid peptide of gp41 expressed on the surface of a plant virus. *Vaccine. 14*:799–810.
208. **Brennan, F.R., Gilleland, L.B., Staczek, J., Bendig, M.M., Hamilton, W.D.O., Gilleland, H.E.**, 1999. A chimaeric plant virus vaccine protects mice against a bacterial infection. *Microbiology (Reading, England). 145 (Pt 8)*:2061–2067.
209. **Swenson, D.L., Warfield, K.L., Negley, D.L., Schmaljohn, A., Aman, M.J., Bavari, S.**, 2005. Virus-like particles exhibit potential as a pan-filovirus vaccine for both Ebola and Marburg viral infections. *Vaccine. 23*:3033–3042.
210. **Jiang, L., Li, Q., Li, M., Zhou, Z., Wu, L., Fan, J., Zhang, Q., Zhu, H., Xu, Z.**, 2006. A modified TMV-based vector facilitates the expression of longer foreign epitopes in tobacco. *Vaccine. 24*:109–115.
211. **Nuzzaci, M., Piazzolla, G., Vitti, A., Lapelosa, M., Tortorella, C., Stella, I., Natilla, A., Antonaci, S., Piazzolla, P.**, 2007. Cucumber mosaic virus as a presentation system for a double hepatitis C virus-derived epitope. *Archives of virology. 152*:915–928.
212. **Lacasse, P., Denis, J., Lapointe, R., Leclerc, D., Lamarre, A.**, 2008. Novel plant virus-based vaccine induces protective cytotoxic T-lymphocyte-mediated antiviral immunity through dendritic cell maturation. *Journal of virology. 82*:785–794.
213. **Netter, H.J., Macnaughton, T.B., Woo, W.P., Tindle, R., Gowans, E.J.**, 2001. Antigenicity and immunogenicity of novel chimeric hepatitis B surface antigen particles with exposed hepatitis C virus epitopes. *Journal of virology. 75*:2130–2141.
214. **Netter, H.J., Woo, W.-P., Tindle, R., Macfarlan, R.I., Gowans, E.J.**, 2003. Immunogenicity of recombinant HBsAg/HCV particles in mice pre-immunised with hepatitis B virus-specific vaccine. *Vaccine. 21*:2692–2697.
215. **Michel, M., Lone, Y.-C., Centlivre, M., Roux, P., Wain-Hobson, S., Sala, M.**, 2007. Optimisation of secretion of recombinant HBsAg virus-like particles: Impact on the development of HIV-1/HBV bivalent vaccines. *Vaccine. 25*:1901–1911.
216. **Greco, R., Michel, M., Guetard, D., Cervantes-Gonzalez, M., Pelucchi, N., Wain-Hobson, S., Sala, F., Sala, M.**, 2007. Production of recombinant HIV-1/HBV virus-like

- particles in *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana* plants for a bivalent plant-based vaccine. *Vaccine*. 25:8228–8240.
217. **Bisht, H., Chugh, D.A., Swaminathan, S., Khanna, N.**, 2001. Expression and purification of Dengue virus type 2 envelope protein as a fusion with hepatitis B surface antigen in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification*. 23:84–96.
 218. **Bisht, H., Chugh, D.A., Raje, M., Swaminathan, S.S., Khanna, N.**, 2002. Recombinant dengue virus type 2 envelope/hepatitis B surface antigen hybrid protein expressed in *Pichia pastoris* can function as a bivalent immunogen. *Journal of biotechnology*. 99:97–110.
 219. **Schödel, F., Moriarty, A.M., Peterson, D.L., Zheng, J.A., Hughes, J.L., Will, H., Leturcq, D.J., McGee, J.S., Milich, D.R.**, 1992. The position of heterologous epitopes inserted in hepatitis B virus core particles determines their immunogenicity. *Journal of virology*. 66:106–114.
 220. **Neiryneck, S., Deroo, T., Saelens, X., Vanlandschoot, P., Jou, W.M., Fiers, W.**, 1999. A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nature medicine*. 5:1157–1163.
 221. **Isaguliant, M.G., Nordlund, S., Sällberg, M., v.d. Smirnov, Rudén, U., Wahren, B.**, 1996. HIV-1 epitopes exposed by hybrid hepatitis B core particles affect proliferation of peripheral blood mononuclear cells from HIV-1 positive donors. *Immunology Letters*. 52:37–44.
 222. **Birkett, A., Lyons, K., Schmidt, A., Boyd, D., Oliveira, G.A., Siddique, A., Nussenzweig, R., Calvo-Calle, J.M., Nardin, E.**, 2002. A modified hepatitis B virus core particle containing multiple epitopes of the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein provides a highly immunogenic malaria vaccine in preclinical analyses in rodent and primate hosts. *Infection and immunity*. 70:6860–6870.
 223. **Schödel, F., Peterson, D., Hughes, J., Milich, D.R.**, 1993. Hybrid Hepatitis B Virus Core/Pre-S Particles: Position Effects on Immunogenicity of Heterologous Epitopes and Expression in Avirulent *Salmonellae* for Oral Vaccination. p. 347–353. In F. Cabello, C. Hormaeche, P. Mastroeni, L. Bonina (Eds.). *Biology of Salmonella*. Springer US; Imprint; Springer. Boston, MA.
 224. **Schödel, F., Milich, D.R., Will, H.**, 1990. Hepatitis B virus nucleocapsid/pre-S2 fusion proteins expressed in attenuated *Salmonella* for oral vaccination. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950). 145:4317–4321.
 225. **Nassal, M., Skamel, C., Kratz, P.A., Wallich, R., Stehle, T., Simon, M.M.**, 2005. A fusion product of the complete *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A (OspA) and the hepatitis B virus capsid protein is highly immunogenic and induces protective immunity similar to that seen with an effective lipidated OspA vaccine formula. *European journal of immunology*. 35:655–665.
 226. **Kratz, P.A., Böttcher, B., Nassal, M.**, 1999. Native display of complete foreign protein domains on the surface of hepatitis B virus capsids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96:1915–1920.

227. **Ormö, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y., Remington, S.J.**, 1996. Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein. *Science (New York, N.Y.)*. 273:1392–1395.
228. **Walker, A., Skamel, C., Nassal, M.**, 2011. SplitCore: an exceptionally versatile viral nanoparticle for native whole protein display regardless of 3D structure. *Scientific reports*. 1:5.
229. **Jegerlehner, A.**, 2002. A molecular assembly system that renders antigens of choice highly repetitive for induction of protective B cell responses. *Vaccine*. 20:3104–3112.
230. **Blokhina, E.A., Kuprianov, V.V., Stepanova, L.A., Tsybalova, L.M., Kiselev, O.I., Ravin, N.V., Skryabin, K.G.**, 2013. A molecular assembly system for presentation of antigens on the surface of HBc virus-like particles. *Virology*. 435:293–300.
231. **Gerlich, W.H., Lu, X., Heermann, K.H.**, 1993. Studies on the attachment and penetration of hepatitis B virus. *Journal of hepatology*. 17:S10-S14.
232. **Lu, X., Block, T.M., Gerlich, W.H.**, 1996. Protease-induced infectivity of hepatitis B virus for a human hepatoblastoma cell line. *Journal of virology*. 70:2277–2285.
233. **Mariyanna, L., Priyadarshini, P., Hofmann-Sieber, H., Krepstakies, M., Walz, N., Grundhoff, A., Buchholz, F., Hildt, E., Hauber, J.**, 2012. Excision of HIV-1 proviral DNA by recombinant cell permeable tre-recombinase. *PloS one*. 7:e31576.
234. **Mitragotri, S.**, 2005. Immunization without needles. *Nature reviews. Immunology*. 5:905–916.
235. **Nir, Y., Paz, A., Sabo, E., Potasman, I.**, 2003. Fear of injections in young adults: prevalence and associations. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 68:341–344.
236. **Betsch, C., Schmid, P., Korn, L., Steinmeyer, L., Heinemeier, D., Eitze, S., Küpke, N.K., Böhm, R.**, 2019. Impfverhalten psychologisch erklären, messen und verändern. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*. 62:400–409.
237. **Amini, M., Behzadnia, M.J., Saboori, F., Bahadori, M., Ravangard, R.**, 2015. Needle-Stick Injuries Among Healthcare Workers in a Teaching Hospital. *Trauma monthly*. 20:e18829.
238. **Kermode, M.**, 2004. Unsafe injections in low-income country health settings: need for injection safety promotion to prevent the spread of blood-borne viruses. *Health promotion international*. 19:95–103.
239. **Kane, A., Lloyd, J., Zaffran, M., Simonsen, L., Kane, M.**, 1999. Transmission of hepatitis B, hepatitis C and human immunodeficiency viruses through unsafe injections in the developing world: model-based regional estimates. *Bulletin of the World Health Organization*. 77:801–807.

240. **Su, F., Patel, G.B., Hu, S., Chen, W.**, 2016. Induction of mucosal immunity through systemic immunization: Phantom or reality? *Human vaccines & immunotherapeutics*. 12:1070–1079.
241. **Mestecky, J., McGhee, J.R.**, 1989. Oral immunization: past and present. *Current topics in microbiology and immunology*. 146:3–11.
242. **Robert-Koch-Institut**, 2019. Schutzimpfung gegen Poliomyelitis: Häufig gestellte Fragen und Antworten. Available at https://www.rki.de/SharedDocs/FAQ/Impfen/Poliomyelitis/FAQ-Liste_Poliomyelitis_Impfen.html#FAQId4598058. Accessed January 27, 2020.
243. **Serradell, M.C., Rupil, L.L., Martino, R.A., Prucca, C.G., Carranza, P.G., Saura, A., Fernández, E.A., Gargantini, P.R., et al.**, 2019. Efficient oral vaccination by bioengineering virus-like particles with protozoan surface proteins. *Nature communications*. 10:361.
244. **Pyrski, M., Mieloch, A.A., Plewiński, A., Basińska-Barczak, A., Gryciuk, A., Bociąg, P., Murias, M., Rybka, J.D., Pniewski, T.**, 2019. Parenteral-Oral Immunization with Plant-Derived HBcAg as a Potential Therapeutic Vaccine against Chronic Hepatitis B. *Vaccines*. 7.
245. **Smet, R. de, Allais, L., Cuvelier, C.A.**, 2014. Recent advances in oral vaccine development: yeast-derived β -glucan particles. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 10:1309–1318.
246. **Jabbal-Gill, I.**, 2010. Nasal vaccine innovation. *Journal of drug targeting*. 18:771–786.
247. **Belshe, R.B., Mendelman, P.M., Treanor, J., King, J., Gruber, W.C., Piedra, P., Bernstein, D.I., Hayden, F.G., et al.**, 1998. The efficacy of live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenzavirus vaccine in children. *The New England journal of medicine*. 338:1405–1412.
248. **Lobaina, Y., Palenzuela, D., García, D., Rodríguez, D., Pichardo, D., Muzio, V., Aguilar, J.C.**, 2006. Comparative study of the immunogenicity and immunoenhancing effects of two hepatitis B core antigen variants in mice by nasal administration. *Vaccine*. 24 Suppl 2:S2-58-9.
249. **Lambert, P.H., Laurent, P.E.**, 2008. Intradermal vaccine delivery: will new delivery systems transform vaccine administration? *Vaccine*. 26:3197–3208.
250. **Das, M., Vanar, V., Martin, D.K., Walayat, S., Patel, J., Badshah, M.B., Kalva, N.R., Pisoh, W.-N., Dhillon, S.**, 2017. Seroconverting nonresponder of high-dose intramuscular HBV vaccine with intradermal HBV vaccine: A case report. *Medicine*. 96.
251. **Kalchiem-Dekel, O., Grupel, D., Bouchnik, L., Sikuler, E., Ben-Yakov, G.**, 2015. Efficacy and long-term durability of intradermal recombinant hepatitis B virus vaccine among intramuscular vaccine nonresponders: A prospective study in healthcare personnel. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 30:1782–1787.

252. **Nagafuchi, S., Kashiwagi, S., Okada, K., Anzai, K., Nakamura, M., Nishimura, Y., Sasazuki, T., Niho, Y.**, 1991. Reversal of nonresponders and postexposure prophylaxis by intradermal hepatitis B vaccination in Japanese medical personnel. *JAMA*. 265:2679–2683.
253. **Ita, K.**, 2016. Transdermal delivery of vaccines - Recent progress and critical issues. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 83:1080–1088.
254. **Barisani-Asenbauer, T., Inic-Kanada, A., Belij, S., Marinkovic, E., Stojicevic, I., Montanaro, J., Stein, E., Bintner, N., Stojanovic, M.**, 2013. The ocular conjunctiva as a mucosal immunization route: a profile of the immune response to the model antigen tetanus toxoid. *PloS one*. 8:e60682.
255. **Roth, Y., Chapnik, J.S., Cole, P.**, 2003. Feasibility of aerosol vaccination in humans. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology*. 112:264–270.
256. **Knowles, B.B., Howe, C.C., Aden, D.P.**, 1980. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science (New York, N.Y.)*. 209:497–499.
257. **Ladner, S.K., Otto, M.J., Barker, C.S., Zaifert, K., Wang, G.H., Guo, J.T., Seeger, C., King, R.W.**, 1997. Inducible expression of human hepatitis B virus (HBV) in stably transfected hepatoblastoma cells: a novel system for screening potential inhibitors of HBV replication. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 41:1715–1720.
258. **Gripon, P., Rumin, S., Urban, S., Le Seyec, J., Glaise, D., Cannie, I., Guyomard, C., Lucas, J., Trepo, C., Guguen-Guillouzo, C.**, 2002. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99:15655–15660.
259. **Lim, K.H., Huang, H., Pralle, A., Park, S.**, 2013. Stable, high-affinity streptavidin monomer for protein labeling and monovalent biotin detection. *Biotechnology and bioengineering*. 110:57–67.
260. **Heermann, K.H., Goldmann, U., Schwartz, W., Seyffarth, T., Baumgarten, H., Gerlich, W.H.**, 1984. Large surface proteins of hepatitis B virus containing the pre-s sequence. *Journal of virology*. 52:396–402.
261. **Laemmli, U.K.**, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680–685.
262. **Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.**, 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 76:4350–4354.
263. **van den Broeck, W., Derore, A., Simoens, P.**, 2006. Anatomy and nomenclature of murine lymph nodes: Descriptive study and nomenclatory standardization in BALB/cAnNCrI mice. *Journal of immunological methods*. 312:12–19.

264. **Barnaba, V., Franco, A., Alberti, A., Balsano, C., Benvenuto, R., Balsano, F.,** 1989. Recognition of hepatitis B virus envelope proteins by liver-infiltrating T lymphocytes in chronic HBV infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 143:2650–2655.
265. **Jin, Y., Shih, W.K., Berkower, I.,** 1988. Human T cell response to the surface antigen of hepatitis B virus (HBsAg). Endosomal and nonendosomal processing pathways are accessible to both endogenous and exogenous antigen. *The Journal of experimental medicine*. 168:293–306.
266. **Chattopadhyay, P.K., Betts, M.R., Price, D.A., Gostick, E., Horton, H., Roederer, M., Rosa, S.C. de,** 2009. The cytolytic enzymes granzyme A, granzyme B, and perforin: expression patterns, cell distribution, and their relationship to cell maturity and bright CD57 expression. *Journal of leukocyte biology*. 85:88–97.
267. **Betts, M.R., Brenchley, J.M., Price, D.A., Rosa, S.C. de, Douek, D.C., Roederer, M., Koup, R.A.,** 2003. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *Journal of immunological methods*. 281:65–78.
268. **Rubio, V., Stuge, T.B., Singh, N., Betts, M.R., Weber, J.S., Roederer, M., Lee, P.P.,** 2003. Ex vivo identification, isolation and analysis of tumor-cytolytic T cells. *Nature medicine*. 9:1377–1382.
269. **Zelinskyy, G., Robertson, S.J., Schimmer, S., Messer, R.J., Hasenkrug, K.J., Dittmer, U.,** 2005. CD8+ T-cell dysfunction due to cytolytic granule deficiency in persistent Friend retrovirus infection. *Journal of virology*. 79:10619–10626.
270. **Mollenhauer, H.H., James Morré, D., Rowe, L.D.,** 1990. Alteration of intracellular traffic by monensin; mechanism, specificity and relationship to toxicity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*. 1031:225–246.
271. **Gu, Q.-L., Huang, X., Ren, W.-H., Shen, L., Liu, B.-Y., Chen, S.-Y.,** 2007. Targeting hepatitis B virus antigens to dendritic cells by heat shock protein to improve DNA vaccine potency. *World Journal of Gastroenterology : WJG*. 13:5911–5917.
272. **Yang, J.-Y., Cao, D.-Y., Xue, Y., Yu, Z.-C., Liu, W.-C.,** 2010. Improvement of dendritic-based vaccine efficacy against hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma by two tumor-associated antigen gene-infected dendritic cells. *Human immunology*. 71:255–262.
273. **Wei, M.-J., Pan, X.-N., Wei, K.-P., Li, X.-H., Liu, X.-L., Zhang, X.-M., Jiang, Y.-L., Zhang, C.-Y., Shen, J.-K.,** 2015. Efficacy of HBV-pulsed DCs in combination with entecavir in patients with chronic hepatitis B infection. *International immunopharmacology*. 27:238–243.
274. **Mihailova, M., Boos, M., Petrovskis, I., Ose, V., Skrastina, D., Fiedler, M., Sominskaya, I., Ross, S., et al.,** 2006. Recombinant virus-like particles as a carrier of B- and T-cell epitopes of hepatitis C virus (HCV). *Vaccine*. 24:4369–4377.

275. **Arora, U., Tyagi, P., Swaminathan, S., Khanna, N.**, 2013. Virus-like particles displaying envelope domain III of dengue virus type 2 induce virus-specific antibody response in mice. *Vaccine*. 31:873–878.
276. **Peyret, H., Gehin, A., Thuenemann, E.C., Blond, D., El Turabi, A., Beales, L., Clarke, D., Gilbert, R.J.C., et al.**, 2015. Tandem fusion of hepatitis B core antigen allows assembly of virus-like particles in bacteria and plants with enhanced capacity to accommodate foreign proteins. *PloS one*. 10:e0120751.
277. **Engelke, M., Mills, K., Seitz, S., Simon, P., Gripon, P., Schnölzer, M., Urban, S.**, 2006. Characterization of a hepatitis B and hepatitis delta virus receptor binding site. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 43:750–760.
278. **Morales, E.S., Parcerisa, I.L., Ceccarelli, E.A.**, 2019. A novel method for removing contaminant Hsp70 molecular chaperones from recombinant proteins. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 28:800–807.
279. **Schieck, A., Schulze, A., Gähler, C., Müller, T., Haberkorn, U., Alexandrov, A., Urban, S., Mier, W.**, 2013. Hepatitis B virus hepatotropism is mediated by specific receptor recognition in the liver and not restricted to susceptible hosts. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 58:43–53.
280. **Duronio, R.J., Jackson-Machelski, E., Heuckeroth, R.O., Olins, P.O., Devine, C.S., Yonemoto, W., Slice, L.W., Taylor, S.S., Gordon, J.I.**, 1990. Protein N-myristoylation in *Escherichia coli*: reconstitution of a eukaryotic protein modification in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87:1506–1510.
281. **Sureau, C., Salisse, J.**, 2013. A conformational heparan sulfate binding site essential to infectivity overlaps with the conserved hepatitis B virus a-determinant. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 57:985–994.
282. **Miller, M.A., Ganesan, A.P.V., Luckashenak, N., Mendonca, M., Eisenlohr, L.C.**, 2015. Endogenous antigen processing drives the primary CD4+ T cell response to influenza. *Nature medicine*. 21:1216–1222.
283. **Jacobson, S., Sekaly, R.P., Bellini, W.J., Johnson, C.L., McFarland, H.F., Long, E.O.**, 1988. Recognition of intracellular measles virus antigens by HLA class II restricted measles virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 540:352–353.
284. **English, L., Chemali, M., Duron, J., Rondeau, C., Laplante, A., Gingras, D., Alexander, D., Leib, D., et al.**, 2009. Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection. *Nature immunology*. 10:480–487.
285. **Tey, S.-K., Khanna, R.**, 2012. Autophagy mediates transporter associated with antigen processing-independent presentation of viral epitopes through MHC class I pathway. *Blood*. 120:994–1004.

286. **Paludan, C., Schmid, D., Landthaler, M., Vockerodt, M., Kube, D., Tuschl, T., Münz, C.**, 2005. Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science (New York, N.Y.)*. 307:593–596.
287. **Schmid, D., Pypaert, M., Münz, C.**, 2007. Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes. *Immunity*. 26:79–92.
288. **Ireland, J.M., Unanue, E.R.**, 2011. Autophagy in antigen-presenting cells results in presentation of citrullinated peptides to CD4 T cells. *The Journal of experimental medicine*. 208:2625–2632.
289. **Rynda-Apple, A., Patterson, D.P., Douglas, T.**, 2014. Virus-like particles as antigenic nanomaterials for inducing protective immune responses in the lung. *Nanomedicine (London, England)*. 9:1857–1868.
290. **Yuan, Q., Ge, S., Xiong, J., Yan, Q., Li, Z., Hao, X., Tian, D., Niu, J., et al.**, 2010. A novel immunoassay for PreS1 and/or core-related antigens for detection of HBsAg variants. *Journal of virological methods*. 168:108–113.
291. **Schulze, A., Schieck, A., Ni, Y., Mier, W., Urban, S.**, 2010. Fine mapping of pre-S sequence requirements for hepatitis B virus large envelope protein-mediated receptor interaction. *Journal of virology*. 84:1989–2000.
292. **Usuda, S., Okamoto, H., Iwanari, H., Baba, K., Tsuda, F., Miyakawa, Y., Mayumi, M.**, 1999. Serological detection of hepatitis B virus genotypes by ELISA with monoclonal antibodies to type-specific epitopes in the preS2-region product. *Journal of virological methods*. 80:97–112.
293. **Song, L.-W., Wang, Y.-B., Fang, L.-L., Wu, Y., Yang, L., Chen, J.-Y., Ge, S.-X., Zhang, J., et al.**, 2015. Rapid fluorescent lateral-flow immunoassay for hepatitis B virus genotyping. *Analytical chemistry*. 87:5173–5180.
294. **Kusumoto, S., Tanaka, Y., Ueda, R., Mizokami, M.**, 2011. Reactivation of hepatitis B virus following rituximab-plus-steroid combination chemotherapy. *Journal of gastroenterology*. 46:9–16.
295. **Paul, S., Dickstein, A., Saxena, A., Terrin, N., Viveiros, K., Balk, E.M., Wong, J.B.**, 2017. Role of surface antibody in hepatitis B reactivation in patients with resolved infection and hematologic malignancy: A meta-analysis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 66:379–388.
296. **Corti, D., Benigni, F., Shouval, D.**, 2018. Viral envelope-specific antibodies in chronic hepatitis B virus infection. *Current opinion in virology*. 30:48–57.
297. **Gao, Y., Zhang, T.-Y., Yuan, Q., Xia, N.-S.**, 2017. Antibody-mediated immunotherapy against chronic hepatitis B virus infection. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 13:1768–1773.

298. **Bhat, P., Leggatt, G., Waterhouse, N., Frazer, I.H.**, 2017. Interferon- γ derived from cytotoxic lymphocytes directly enhances their motility and cytotoxicity. *Cell death & disease*. 8:e2836.
299. **Kang, S., Brown, H.M., Hwang, S.**, 2018. Direct Antiviral Mechanisms of Interferon-Gamma. *Immune network*. 18:e33.
300. **Lenz, A., Heine, M., Schuler, G., Romani, N.**, 1993. Human and murine dermis contain dendritic cells. Isolation by means of a novel method and phenotypical and functional characterization. *The Journal of clinical investigation*. 92:2587–2596.
301. **Spellberg, B.**, 2000. The cutaneous citadel: a holistic view of skin and immunity. *Life sciences*. 67:477–502.
302. **Nicolas, J.-F., Guy, B.**, 2008. Intradermal, epidermal and transcutaneous vaccination: from immunology to clinical practice. Expert review of vaccines. 7:1201–1214.
303. **Flacher, V., Bouschbacher, M., Verronèse, E., Massacrier, C., Sisirak, V., Berthier-Vergnes, O., Saint-Vis, B. de, Caux, C., et al.**, 2006. Human Langerhans cells express a specific TLR profile and differentially respond to viruses and Gram-positive bacteria. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 177:7959–7967.
304. **van den Berg, L.M., Cardinaud, S., van der Aar, A.M.G., Sprokholt, J.K., Jong, M.A.W.P. de, Zijlstra-Willems, E.M., Moris, A., Geijtenbeek, T.B.H.**, 2015. Langerhans Cell-Dendritic Cell Cross-Talk via Langerin and Hyaluronic Acid Mediates Antigen Transfer and Cross-Presentation of HIV-1. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 195:1763–1773.
305. **Hohlfeld, R., Engel, A.G.**, 1994. The immunobiology of muscle. *Immunology today*. 15:269–274.
306. **Hutin, Y.J.F., Hauri, A.M., Armstrong, G.L.**, 2003. Use of injections in healthcare settings worldwide, 2000: literature review and regional estimates. *BMJ (Clinical research ed.)*. 327:1075.
307. **Du, G., Woythe, L., van der Maaden, K., Leone, M., Romeijn, S., Kros, A., Kersten, G., Jiskoot, W., Bouwstra, J.A.**, 2018. Coated and Hollow Microneedle-Mediated Intradermal Immunization in Mice with Diphtheria Toxoid Loaded Mesoporous Silica Nanoparticles. *Pharmaceutical research*. 35:189.
308. **Novak, N., Haberstick, J., Bieber, T., Allam, J.-P.**, 2008. The immune privilege of the oral mucosa. *Trends in molecular medicine*. 14:191–198.
309. **Date, Y., Ebisawa, M., Fukuda, S., Shima, H., Obata, Y., Takahashi, D., Kato, T., Hanazato, M., et al.**, 2017. NALT M cells are important for immune induction for the common mucosal immune system. *International immunology*. 29:471–478.
310. **Lü, F.X., Jacobson, R.S.**, 2007. Oral mucosal immunity and HIV/SIV infection. *Journal of dental research*. 86:216–226.

- 311. **Schulz, O., Pabst, O.**, 2013. Antigen sampling in the small intestine. *Trends in immunology*. 34:155–161.
- 312. **Cerutti, A., Chen, K., Chorny, A.**, 2011. Immunoglobulin responses at the mucosal interface. *Annual review of immunology*. 29:273–293.
- 313. **Dandri, M., Lütgehetmann, M.**, 2014. Mouse models of hepatitis B and delta virus infection. *Journal of immunological methods*. 410:39–49.
- 314. **Tzeng, H.-T., Tsai, H.-F., Liao, H.-J., Lin, Y.-J., Chen, L., Chen, P.-J., Hsu, P.-N.**, 2012. PD-1 blockage reverses immune dysfunction and hepatitis B viral persistence in a mouse animal model. *PloS one*. 7:e39179.
- 315. **Joyce, M.G., Sankhala, R.S., Chen, W.-H., Choe, M., Bai, H., Hajducski, A., Yan, L., Sterling, S.L., et al.**, 2020. A Cryptic Site of Vulnerability on the Receptor Binding Domain of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Geografische Verteilung der HBV Genotypen.	2
Abbildung 2: Struktur des Hepatitis-B-Virus und der subviralen Partikel.	3
Abbildung 3: Schematische Darstellung des HBsAg.	5
Abbildung 4: Core-Protein und Capsid des HBV.	7
Abbildung 5: Organisation des Genoms des Hepatitis-B-Virus.	9
Abbildung 6: Lebenszyklus des Hepatitis-B-Virus.	12
Abbildung 7: Globale Prävalenz an HBV-Infektionen.	14
Abbildung 8: Verlauf einer akuten Hepatitis B mit serologischen Markern.	16
Abbildung 9: Verlauf einer chronischen HBV-Infektion.	19
Abbildung 10: Zusammenfassung des Forschungsvorhabens.	31
Abbildung 11: <i>Ex vivo</i> Transdermal-Pflaster-System.	54
Abbildung 12: Aufbauschema eines Semi-Dry Western Blot.	64
Abbildung 13: Ablauf der Immunisierung.	71
Abbildung 14: Transdermales Pflastersystem.	72
Abbildung 15: Konstruktion des Vektors pRSET-mSA-PreS1-PreS2.	74
Abbildung 16: Proteinreinigung von rekombinantem mSA_preS1/2 mittels Affinitätschromatografie.	76
Abbildung 17: Aufbau der rekombinanten Proteine TLMcore und Δ TLMcore.	77
Abbildung 18: Reinigung von TLMcore und Δ TLMcore mittels Affinitätschromatografie.	78
Abbildung 19: Assemblierung von TLM- und Δ TLMcapsiden.	79
Abbildung 20: Bindung von mSA_preS1/2 an TLM- und Δ TLMcapside.	80
Abbildung 21: SPR-Analyse zur Bindung von mSA_preS1/2 an TLM- und Δ TLMcapside.	82
Abbildung 22: <i>In vitro</i> Zellpermeabilität von beladenen und unbeladenen TLMcapsiden.	84
Abbildung 23: <i>In vivo</i> -Imaging zur Analyse der Biodistribution nach intraperitonealer Injektion.	87
Abbildung 24: Distribution von Antigen-beladenen TLM- und Δ TLMcapsiden in der Leber.	88
Abbildung 25: Spiegel der mSA_preS1/2-spezifischen Antikörper nach intraperitonealer Immunisierung.	90
Abbildung 26: Antikörper nach Immunisierung mit freiem oder an Trägercapside gebundenem mSA_preS1/2 decken die Rezeptorbindedomäne im mSA_preS1/2-Peptidarray ab.	91
Abbildung 27: Überwachung einer <i>in vitro</i> HBV-Infektion nach einer Inkubation mit verdünnten Seren immunisierter Mäuse.	93
Abbildung 28: FACS-Analyse von intrazellulärem Granzym A und CD107a.	96
Abbildung 29: Lyse von HBV-positiven AML12 Zellen nach Co-Kultivierung mit Lymphozyten immunisierter Mäuse.	98
Abbildung 30: Transdermale Aufnahme von Vakzin und Kontrollen <i>ex vivo</i> .	100
Abbildung 31: Antikörperantwort nach transdermaler Immunisierung.	101
Abbildung 32: Antikörperantwort nach oral-mukosaler Immunisierung.	102
Abbildung 33: Vergleich der Antikörperantwort bei Verwendung verschiedener Immunisierungsrouten.	103

Abbildung 34: HBsAg-Level an Tag 8 einer <i>in vitro</i> HBV-Infektion nach Pränkubation mit 1:20 verdünnten Seren transdermal und oral immunisierter Mäuse.	105
Abbildung 35: Oral-mukosale Immunisierung: Lyse von HBV-positiven AML12 Zellen nach Co-Kultivierung mit Splenozyten immunisierter Mäuse.	107
Abbildung 36: Transdermale Immunisierung: Lyse von HBV-positiven AML12 Zellen nach Co-Kultivierung mit Lymphozyten immunisierter Mäuse.	109

8 Abkürzungsverzeichnis

ALT	Alanin-Aminotransferase
AGL	<i>antigenic loop</i> ; Antigen-Loop
AP1	<i>activator protein 1</i>
APC	<i>Antigen presenting cell</i> ; Antigen-präsentierende Zelle
AS	Aminosäure
ASHV	<i>arctic squirrel hepatitis virus</i> ; Ziesel-Hepatitis-Virus
AST	Aspartat-Aminotransferase
AuAg	Australia Antigen
cccDNA	<i>covalently closed circular DNA</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i> ; Unterscheidungsmerkmal
ChHBV	<i>chimpanzee HBV</i> , Schimpansen-HBV
CLSM	<i>Confocal laser scanning microscope</i> ; konfokales Laser-Scanning-Mikroskop
CPMV	<i>cowpea mosaic virus</i> ; Kuhbohnenmosaikvirus
c-raf-1	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma-1</i>
CTL	<i>cytotoxic T-lymphocyte</i> ; zytotoxischer T-Lymphozyt
CV	<i>column volume</i> ; Säulenvolumen
DC	<i>Dendritic cell</i> ; Dendritische Zelle
Den2E	<i>dengue virus typ 2 envelope protein</i>
DHBV	<i>duck HBV</i> ; Enten-HBV
DOL	<i>Degree of labeling</i> ; Markierungsgrad
DR	<i>directed repeats</i>
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EC	Effektorzellen
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i> ; verbessertes grün-fluoreszierendes Protein
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EM	Elektronenmikroskopie
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK2	<i>extracellular signal-regulated kinase 2</i>
ESCRT	<i>Endosomal sorting complex required for transport</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i> ; Fluoreszenz-basierte Zellsortierung
GALT	<i>gut-associated lymphoid tissue</i> ; Darm-assoziiertes Immunsystem
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GiHBV	Gibbon-HBV
GoHBV	Gorilla-HBV
GSHV	<i>ground squirrel hepatitis virus</i> ; Erdhörnchen-Hepatitis-Virus
gt	Genotyp
HA	Hämagglutinin
HBcAg	Hepatitis B Core Antigen
HBeAg	Hepatitis B e Antigen
HBsAg	<i>Hepatitis B surface antigen</i> ; Hepatitis B Oberflächenantigen
HBV	Hepatitis-B-Virus
HBx	Hepatitis B X Antigen
HCC	<i>Hepatocellular carcinoma</i> ; Hepatozelluläres Karzinom

HCV	Hepatitis-C-Virus
HHBV	<i>heron</i> HBV; Reiher-HBV
HIV	Humanes Immunodefizienzvirus
hNTCP	Humanes NTCP
HPV	Humanes Papillomvirus
HRP	<i>Horse radish peroxidase</i> ; Meerrettichperoxidase
Hsp	<i>Heat-shock protein</i> ; Hitzeschockprotein
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykane
HVR	Hypervariable Region
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
IPV	Inaktiviertes Poliovakzin
IRF	IFN-regulatorischer Faktor
IVIS	<i>In-vivo-Imaging system</i>
KD	Dissoziationskonstante
LAMP-1	<i>Lysosomal-associated membrane protein 1</i> ; Lysosom-assoziiertes Membranprotein 1
LC	<i>Langerhans cells</i> ; Langerhans-Zellen
LCMV	Lymphozytisches Choriomeningitisvirus
LHBs	<i>Large Hepatitis B surface antigen</i> ; großes HBV Oberflächenprotein
LTR	<i>Long terminal repeat</i>
mAU	<i>milli absorbance units</i>
MAVS	<i>Mitochondrial antiviral signaling</i>
mDC	myeloide DC
MHBs	<i>Middle Hepatitis B surface antigen</i> ; mittleres HBV Oberflächenprotein
MHC	<i>major histo-compatibility complex</i> ; Haupthistokompatibilitätskomplex
MLV	Murines Leukämievirus
mNTCP	Maus-NTCP
MOI	<i>Multiplicity of infection</i> ; Multiplizität der Infektion
mSA	monomeres Streptavidin
MVB	<i>Multivesicular bodies</i>
M-Zelle	<i>Microfold</i> Zelle
NA	Nukleot(s)idanalogen
NALT	<i>nasal-associated lymphoid tissue</i> ; nasal-assoziiertes Immunsystem
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NLS	Nukleare Lokalisationssequenz
NTA	Nitrilotriessigsäure
NTCP	<i>sodium taurocholate cotransporting polypeptide</i>
OCT	<i>Optimal cutting temperature</i>
OD	Optische Dichte
OPV	Orales Poliovakzin
ORF	<i>open reading frame</i> ; offener Leserahmen
OspA	<i>Outer surface protein A</i>

OuHBV	Orang-Utan-HBV
OVA	Ovalbumin
P	Polymerase
PAE	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patter</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerasekettenreaktion
PD-1	<i>Programmed death-1</i>
PD-L	PD-Ligand
pgRNA	prägenomische RNA
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Azetat
PMED	<i>particle-mediated epidermal delivery</i>
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
rcDNA	<i>relaxed circular DNA</i>
RIG-I	<i>Retinoic acid inducible gene I</i>
s.c.	Subkutan
s/co	<i>signal/cut-off</i>
SDS-PAGE	<i>Sodiumdodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> ; Natriumdodecylsulfatpolyacrylamidgelelektrophorese
SGHBV	<i>snow goose</i> HBV; Schneegans-HBV
SHBs	Small Hepatitis B surface antigen; kleines HBV Oberflächenprotein
SIV	<i>simian immunodeficiency virus</i> ; Affenimmunodefizienzvirus
SPR	<i>Surface plasmon resonance spectroscopy</i> ; Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie
STIKO	Ständige Impfkommission
T	Triangulationszahl
TC	<i>target cells</i> ; Zielzellen
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TLM	<i>Translocation motif</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TM	Transmembranregion
TMB	Tetramethylbenzidin
VLP	<i>virus-like particle</i> ; Virus-ähnliches Partikel
VSP	<i>Variant-specific surface protein</i>
WB	Western Blot
WHV	<i>woodchuck hepatitis virus</i> ; Waldmurmeltier-Hepatitis-Virus
WMHBV	<i>woolly monkey</i> HBV; Wollaffen-HBV

9 Danksagung

Ich möchte Prof. Dr. **Eberhard Hildt** danken. Für seinen Enthusiasmus, seine Begeisterungsfähigkeit, seine positive Grundeinstellung – und vor allem für das mir entgegengebrachte Vertrauen meinen eigenen Weg in diesem Projekt gehen zu dürfen und meinen Ideen mit Rat und außergewöhnlicher Expertise zur Seite zu stehen. Für die Möglichkeit als Wissenschaftler wachsen zu dürfen und allen voran für seine bedingungslose wissenschaftliche Integrität.

Ebenso gilt mein Dank Prof. Dr. **Beatrix Süß** für die Betreuung an der Technischen Universität Darmstadt sowie für die Begutachtung dieser Arbeit.

Ich bedanke mich herzlich bei **Robin Hobe Murra** und **Gert Carra** für die Geduld mit mir und die großartige Instandhaltung des gesamten Labors. Zusätzlich danke ich **Robin** für die extrem schnelle und präzise Mithilfe an der Revision.

Danke auch an Dr. **Sami Akhras** und Dr. **Fabian Elgner** für ein stets offenes Ohr und eure fächerübergreifende Expertise, die mich während dieser Zeit immer und immer wieder vorangebracht hat. **Sami**, danke für die tolle Betreuung und das ein oder andere Gespräch über Mandelbrot-Fraktale und den goldenen Schnitt in HBV-Capsiden.

Natürlich danke ich der gesamten Hildt AG: **Dagmar, Jasminka, Frauke, Dani, Kiyoshi, Vanessa, Younes, Sarah, Bingfu, Jian, Yan, Jan, Hussein, Catarina, Patrycja**. Oh und selbstverständlich **Ise**!

Ganz besonderer Dank gilt *eo ipso* den beiden Menschen deren Anwesenheit *cum hoc, ergo propter hoc* (hier völlig ohne Scheinkausalität) zu einer erfolgreichen Arbeit und großartigen Zeit geführt haben. Danke **Catrina Kampuma Spengler** für jedes mitinterpretierte Ergebnis, jede Planung und all die immunologische Hilfe. Danke für die unzähligen, wissenschaftlichen Diskussionen auch weit nach Feierabend. Und danke für deinen Humor, dein integeres Wesen und die unvergessliche Zeit. Danke **Mirco Mupko Glitscher** für dein beeindruckendes Fachwissen in „kurios“ vielen Bereichen, dein offenes Ohr in vielen Lebenslagen und auch dir für die tolle Zeit im und außerhalb des PEI. Euch beiden ein Danke für jedes überlaute „PAH!“, das ihr mir entlocken konntet.

Als letztes möchte ich mich bei allen bedanken, die mich in dieser Zeit in kleineren oder größeren Belangen unterstützt haben – oder auch einfach mal für eine schöne und tolle Zeit gesorgt haben.

Vielen Dank!

10 Veröffentlichungen

Publikationen

Tobias Zahn, Sami Akhras, Catrina Spengler, Robin Oliver Murra, Thomas Holzhauser, Eberhard Hildt. 2020. *A new approach for therapeutic vaccination against chronic HBV infections*. Vaccine; 2020 38(15):3105-3120

Sämtliche Ergebnisdarstellungen (Abb. 15-36) dieser Dissertation, mit Ausnahme der Abbildung 15, Abbildung 17 und Abbildung 28, wurden in englischer Sprache in oben genannter Publikation veröffentlicht.

Präsentationen

PEI Retreat, Januar 2019, Ronneburg.

„A new approach for therapeutic vaccination against chronic HBV infections“

Poster

Konferenz der Gesellschaft für Virologie, 2019, Düsseldorf

„A new approach for therapeutic vaccination against chronic HBV infections“

Konferenz der Gesellschaft für Virologie, 2018, Würzburg

„A new approach for therapeutic vaccination against chronic HBV infections“

PEI Retreat, Januar 2018, Ronneburg.

„A new approach for therapeutic vaccination against chronic HBV infections“

Konferenz der Gesellschaft für Virologie, 2017, Marburg

„A new approach for therapeutic vaccination against chronic HBV infections“

PEI Retreat, Januar 2017, Ronneburg.

„A new approach for therapeutic vaccination against chronic HBV infections“

Lebenslauf

Persönliches

Name: Tobias Zahn

Geburtstag: 21.04.1989

Geburtsort: Frankfurt (Oder)

Ausbildung

03/2016 bis 07/2019	Doktorand Abteilung für Virologie Paul-Ehrlich-Institut (Langen) Gruppe Prof. Dr. Eberhard Hildt <i>A new approach for therapeutic vaccination against chronic hepatitis B virus infections</i>
08/2015 bis 03/2016	Abschluss Master of Science Technische Hochschule Mittelhessen (Gießen) Masterarbeit in der Gruppe Prof. Dr. Eberhard Hildt Paul-Ehrlich-Institut (Langen) <i>Effekte der Inhibition und Aktivierung von Nrf2 auf KLF9 in Hepatitis-B-Virus-Infektionen</i>
03/2014 bis 3/2016	Studium der Biotechnologie/biopharmazeutischen Technologie (Master of Science) Technische Hochschule Mittelhessen (Gießen)
08/2013 bis 02/2014	Abschluss Bachelor of Science und Ingenieur Technische Hochschule Mittelhessen (Gießen) Bachelorarbeit in Gruppe Prof. Dr. Jürgen Hemberger BiTE GmbH (Gießen) <i>Effekt von Blutegel-Saliva auf den Tumor-Nekrose-Faktor α</i>
10/2009 bis 02/2014	Studium der Biotechnologie/biopharmazeutischen Technologie (Bachelor of Science/Ingenieur) Technische Hochschule Mittelhessen (Gießen)
06/2008	Abitur Altes Kurfürstliches Gymnasium, Bensheim

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe. Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht. Die eingereichte elektronische Version stimmt mit der schriftlichen Version überein. "

Frankfurt am Main, den 25. Juni 2020



Unterschrift